

PRICILA DA SILVA CUNHA

**CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES DA
SUBUNIDADE α DA β -CONGLICININA E *GmFAD2-1A* DURANTE
O DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE DE SOJA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010**

PRICILA DA SILVA CUNHA

**CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES DA
SUBUNIDADE α DA β -CONGLICININA E *GmFAD2-1A* DURANTE
O DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2010.

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Co-Orientador)

Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Co-Orientador)

Prof.^a Juliana Lopes Rangel Fietto

Dr.^a Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira

Prof. Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

A Deus e à Nossa Senhora,

Aos meus queridos pais, José Afonso e Jovita,

À minha irmã e amiga, Giselli.

Por serem a razão da minha vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças nos momentos mais difíceis, por ter iluminado meus passos e minha vida, me mostrando que se Ele está do meu lado eu sou capaz de vencer!

À Nossa Senhora, minha Mãezinha, que sempre esteve do meu lado, segurando a minha mão e me acolhendo em seus braços, me dando provas constantes da sua presença e proteção.

Ao meu pai José Afonso, exemplo de vida e caráter, que durante sete anos me acompanhou dia após dia desde que entrei na universidade. Sua paciência, carinho, amor e compreensão me fizeram chegar até aqui. Eu nunca teria conseguido se não fosse por você, meu amado Pai! Essa vitória também é sua!

À minha mãe e amiga Jovita, pelo seu amor incondicional, conselhos, orações e presença constante na minha vida. Com suas palavras de incentivo você fez as dificuldades parecerem pequenas e os sonhos se tornarem reais. Você é minha fortaleza!

À minha irmã e amiga Giselli, pela sua amizade, carinho e cumplicidade. Por sonhar comigo os meus sonhos e acreditar, mais do que ninguém, que o maior deles ainda pode se tornar real!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola pela oportunidade de realização de um curso de excelente qualidade.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) por fornecer o local ideal para realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira pela confiança em mim depositada, pelo apoio, orientação e paciência.

Ao Professor Luciano Gomes Fietto pela atenção, paciência, co-orientação e, acima de tudo, pela amizade!

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros pela co-orientação.

À Professora Juliana Lopes Rangel Fietto pelo carinho e por ter aceitado participar da minha banca de defesa.

À Doutora Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira pela participação na minha banca de defesa e, antes de tudo, pela amizade, carinho, apoio e ajuda nos experimentos de quantificação de proteína.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por todo o aprendizado.

Aos Professores Paulo Roberto Cecon e Fernando Pinheiro Reis pela ajuda tão preciosa nas interpretações estatísticas.

À Professora Márcia Rogéria de Almeida Lamego pela disponibilização do aparelho de PCR em tempo real para a realização dos experimentos de qRT-PCR.

À minha querida tia Maria por ser uma segunda mãe e torcer tanto pelo meu sucesso.

Às minhas primas e amigas Kátia e Graziela, que fizeram dos meus momentos de descanso os mais alegres e inesquecíveis durante todos esses anos! Vocês são fundamentais na minha vida!

À minha madrinha Ednéia pelo incentivo e carinho.

Aos familiares que tanto torceram e rezaram por mim.

À Mariana e Marcão pela paciência, amizade e ajuda essencial no meu projeto de Mestrado. Serei eternamente grata a vocês!

À amiga Maria Andréia pela ajuda nos experimentos iniciais, sempre tão prestativa e carinhosa.

À Dani e ao Lucas por terem me ajudado nas extrações de RNA e pela amizade e carinho tão verdadeiros!

À Ireninha pela ajuda nos experimentos de qRT-PCR.

À amiga Denise por sempre acreditar que tudo ia dar certo!

Às amigas do Laboratório de Sequenciamento de DNA, Magali, Roberta, Cassiana, Michellia, Ana Paula, Carol, Bia, Camila, Rafa, Wiliane, Maíra, Flávia, Mari e Lorena por terem tornado os dias no laboratório tão alegres e a jornada mais amena. Sentirei saudades de todos!

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Proteína, Biomol e Análises Bioquímicas por me ajudarem tão prontamente todas as vezes que precisei.

Às amigas Jerusa, Larissa e Bruninha pelo grande carinho.

Aos meus queridos amigos da Bioquímica 2003 e da Bioquímica Agrícola, que ficarão para sempre guardados na memória e no coração. Obrigada por todo esse tempo de convivência!

Aos funcionários Cássio, Zé Carlos, Sr. Cupertino, Gláucia, Marlene e Eduardo pela competência e auxílio sempre com boa vontade.

Aos amigos da Biblioteca pelos momentos de descontração e carinho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

PRICILA DA SILVA CUNHA, filha de José Afonso de Araújo Cunha e Jovita Maria Cunha, nasceu em 26 de agosto de 1982, em Barbacena, MG.

Em março de 2003 ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, MG, graduando-se como bacharel em Bioquímica em janeiro de 2008. Durante a graduação desenvolveu atividades de Iniciação Científica na linha de pesquisa de Biologia Molecular de Plantas (2005/2007) no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV).

Em março de 2008 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1- Melhoramento genético de plantas e composição lipídica da semente de soja	4
2.2- Genes que codificam para enzimas ω -6 dessaturases microsossomais de soja.....	7
2.3- Importância dos promotores tecido/órgão-específicos e de seus <i>cis</i> -elementos na transformação genética de plantas	13
2.4- Proteína β -conglucina da semente de soja	17
2.5- Silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) em plantas	21
3- OBJETIVOS	24
3.1- Objetivo Geral	24
3.2- Objetivos Específicos	24
4- MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1- Material genético	26
4.2- Determinação da porcentagem de proteína total pelo método de Kjeldahl.....	27
4.3- Extração de proteínas de sementes de soja e quantificação da subunidade α da β -conglucina por SDS-PAGE/densitometria	28
4.4- Análise do padrão de expressão dos genes <i>BC</i> e <i>GmFAD2-1A</i> por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	29
4.4.1- Extração de RNA total de sementes de soja	29
4.4.2- Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA	30
4.4.3- Desenho dos <i>primers</i> para PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	32
4.4.4- PCR em Tempo Real (qRT-PCR)	34
4.5- Análises estatísticas	34
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

5.1- Avaliação da porcentagem de proteína total nas sementes maduras das cinco variedades de soja	36
5.2- Determinação da concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina em vários estádios do desenvolvimento da semente de soja	37
5.3- Análise do padrão de expressão dos genes <i>BC</i> e <i>GmFAD2-1A</i> durante o desenvolvimento da semente de soja através da técnica de PCR em Tempo Real	45
5.3.1- Análise do padrão de expressão dos genes <i>BC</i> e <i>GmFAD2-1A</i> utilizando o gene <i>GAPDH</i> como controle endógeno	46
5.3.2- Análise do padrão de expressão dos genes <i>BC</i> e <i>GmFAD2-1A</i> utilizando o gene <i>EF1b</i> como controle endógeno	62
6- CONCLUSÕES	76
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	95

RESUMO

CUNHA, Pricila da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010.
Correlação entre a expressão dos genes da subunidade α da β -conglícinina e *GmFAD2-1A* durante o desenvolvimento da semente de soja. Orientador: Maurilio Alves Moreira. Co-orientadores: Luciano Gomes Fietto e Everaldo Gonçalves de Barros.

O aumento no conteúdo de ácido oléico e diminuição nos níveis dos ácidos graxos polinsaturados (linolênico e linoléico) na semente de soja pode ser alcançado pela redução da atividade da enzima ω -6 dessaturase microssomal através do silenciamento do gene *GmFAD2-1A* que codifica para essa enzima, resultando na produção de óleos com elevada estabilidade oxidativa. O silenciamento deve ocorrer especificamente na semente de forma a não alterar as características agrônômicas da planta e não interferir negativamente no seu crescimento e desenvolvimento. Para isso, o transgene deve estar sob controle de um promotor semente-específico como o promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina (promotor pBC). O principal objetivo desse trabalho foi correlacionar o padrão de expressão do gene que codifica a subunidade α da β -conglícinina (gene *BC*) com o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* ao longo do desenvolvimento da semente de soja em cinco variedades que diferem quanto ao teor protéico (“normal” e “alto”) e ao ciclo de vida (precoce e tardio). E, através dessa correlação, analisar se o promotor pBC apresenta potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética de soja que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A*. A análise do padrão de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* foi feita por PCR em Tempo Real (qRT-PCR) utilizando dois controles endógenos (*GAPDH* e *EF1b*). A subunidade α da β -conglícinina foi quantificada por SDS-PAGE/densitometria durante o desenvolvimento da semente em todos os cinco cultivares. De modo geral, a concentração da subunidade α da β -conglícinina foi inferior em estádios iniciais de desenvolvimento da semente, aumentando em estádios do meio para o final da maturação, indicando que ocorreu um acúmulo desse polipeptídeo ao longo do enchimento do grão, e apresentando uma concentração alta e significativa na semente madura. As variedades de teor protéico “normal” apresentaram concentrações superiores da subunidade α quando comparadas com suas respectivas isolinhas de maiores teores protéicos, o que ocorreu em estádios do meio para o final da maturação.

Os dois genes endógenos (*GAPDH* e *EF1b*) normalizaram os dados de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* de modo muito similar, com as principais diferenças ocorrendo nos perfis de expressão dos dois genes alvos em estádios do meio e final da maturação nas variedades de ciclo precoce. Entretanto, *GAPDH* foi melhor normalizador do que *EF1b*, mostrando expressão mais estável entre todos os tratamentos. De modo geral, o gene *BC* apresentou maior padrão de expressão em estádios do início e meio da maturação da semente, sendo que nesses estádios pode-se sugerir que o promotor pBC atingiu sua capacidade máxima para ativar a transcrição do gene alvo, com a expressão do gene *BC* diminuindo em direção aos estádios finais de desenvolvimento da semente. Pode-se sugerir que essa diminuição na expressão do gene *BC* esteja associada à uma diminuição na atividade do promotor pBC, embora ele ainda permanecesse suficientemente ativo para garantir um nível alto de expressão do transgene em futuros experimentos transformação genética de soja. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no padrão de expressão do gene *BC* quando se comparou uma variedade de soja e sua respectiva isolinha de maior teor protéico ao longo do desenvolvimento da semente. De modo geral, enquanto a concentração da subunidade α foi inferior em estádios iniciais da maturação (1° e 2°), o gene *BC* apresentou maior padrão de expressão em estádios do início e meio do desenvolvimento da semente (2° e 3°). A partir do 3° estágio em direção ao final da maturação, houve um aumento na concentração da subunidade α enquanto verificou-se uma diminuição na expressão do gene *BC* em vários desses estádios. A principal diferença foi encontrada na semente madura de todas as variedades que apresentou uma alta concentração do polipeptídeo, apesar de uma expressão quase nula do gene *BC*. De forma geral, não foi encontrado um padrão de expressão do gene *BC* e de concentração da subunidade α que permitisse diferenciar o grupo de variedades de ciclo tardio do grupo de ciclo precoce. Em relação ao gene *GmFAD2-1A*, de modo geral, as variedades de ciclo tardio apresentaram maior padrão de expressão gênica em estádios do meio para o final do desenvolvimento da semente, enquanto nos cultivares de ciclo precoce o gene *GmFAD2-1A* mostrou maior padrão de expressão em estádios do início e meio da maturação. Assim como para o gene *BC* a expressão de *GmFAD2-1A* foi quase nula na semente madura para todas as variedades. De modo geral, a correlação entre o padrão de expressão dos genes *BC* e

GmFAD2-1A nas variedades de ciclo tardio mostrou que nos estádios em que houve maior taxa de transcrição do gene *GmFAD2-1A* a expressão do gene *BC* diminuiu após atingir um pico de expressão no 3º estágio. Entretanto, a expressão do gene *BC* foi ainda superior à do gene *GmFAD2-1A* nesses estádios. Dessa forma, para os cultivares de ciclo tardio, nos estádios em que o gene *GmFAD2-1A* apresentou os maiores valores de expressão pode-se sugerir que o promotor pBC está ativo ou com uma capacidade máxima para ativar a transcrição do gene alvo. Nos cultivares de ciclo precoce essa correlação mostrou que os genes *BC* e *GmFAD2-1A* apresentaram um padrão de expressão semelhante, com valores elevados de expressão gênica em estádios do início e meio da maturação (2º e 3º), diminuindo em estádios posteriores de desenvolvimento da semente. Portanto, pode-se sugerir que a maior atividade do promotor pBC ocorreu nos mesmos estádios em que foram encontrados os maiores valores de expressão do gene *GmFAD2-1A*. Dessa forma, pode-se sugerir que o promotor do gene da subunidade α da β -conglitinina apresenta elevado potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A* ao longo do desenvolvimento da semente de soja em todos os cultivares analisados.

ABSTRACT

CUNHA, Pricila da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2010.
Correlation between the genes expression of the β -conglycinin α subunit and *GmFAD2-1A* during soybean seed development. Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-Advisers: Luciano Gomes Fietto and Everaldo Gonçalves de Barros.

The increase of the oleic acid content and decrease of the polyunsaturated fatty acids levels (linolenic and linoleic) in the soybean seed may be achieved by reducing of the microsomal ω -6 desaturase enzyme activity through *GmFAD2-1A* gene silencing which codify this enzyme, resulting in the production of oils with high oxidative stability. The gene silencing must occur specifically in the seed, as it must not alter plant agronomics characteristics and not to interfere negatively with plant growth and development. For that, the transgene must be under the control of a seed-specific promoter such as the promoter of the β -conglycinin α subunit gene (pBC promoter). The main objective of this work was to correlate the gene expression pattern that codify the β -conglycinin α subunit (*BC* gene) with the *GmFAD2-1A* gene expression pattern during the soybean seed development in five soybean cultivars that differ in the protein content (“normal” and “high”) and life cycle (early and late maturity). And, through this correlation, to analyse if the pBC promoter presents potential to be used in future experiments of soybean genetic transformation which has as goal to silence the *GmFAD2-1A* gene. The analysis of the *BC* and *GmFAD2-1A* genes expression pattern was done by Real Time PCR (qRT-PCR) using two endogenous controls (*GAPDH* and *EF1b*). The β -conglycinin α subunit was quantified by SDS-PAGE/densitometry during seed development in all five cultivars. In general, the β -conglycinin α subunit concentration was lower in initial stages of seed development, increasing in middle stages towards the final of maturation, indicating that there was an accumulation of this polypeptide during the seed filling, and presenting a high and significative concentration in the mature seed. The cultivars of “normal” protein content showed higher α subunit concentrations when compared with their respective isolines of higher protein content, which occurred in middle stages towards the final maturation. The two endogenous genes (*GAPDH* and *EF1b*) normalized the *BC* and *GmFAD2-1A* genes expression data in a very similar way, with the main differences occurring in the expression patterns of

the two target genes in the middle and final stages of maturation in the early maturity cultivars. However, *GAPDH* was a better normalizer gene than *EF1b*, showing a more stable expression among all treatments. In general, the *BC* gene showed higher expression pattern in initial and middle stages of the seed maturation, and in these stages can be suggested that the pBC promoter reached its maximum capacity to activate transcription of the target gene, with the *BC* gene expression decreasing towards final stages of the seed development. It can be suggested that this decreasing in *BC* gene expression is associated with a decreasing in pBC promoter activity, although the pBC promoter still remains sufficiently active to ensure a high level of transgene expression in future experiments of soybean genetic transformation. None significant difference was found in *BC* gene expression pattern when was compared a soybean cultivar and its respective isolate of higher protein content during seed development. In general, while the α subunit concentration was lower in initial stages of maturation (1st and 2nd), the *BC* gene showed a higher expression pattern in initial and middle stages of seed development (2nd and 3rd). From the third stage towards the final of maturation, there was an increase in the α subunit concentration while there was a decreasing in *BC* gene expression in several of these stages. The main difference was found in mature seed of all cultivars, which showed a high polypeptide concentration despite of an almost null expression of the *BC* gene. In general, it was not found a *BC* gene expression pattern and of α subunit concentration that allowed to differentiate the group of late maturity cultivars of the group of early maturity cultivars. For the *GmFAD2-1A* gene, in general, the late maturity cultivars showed higher gene expression pattern in middle stages towards the final of seed development, while in early maturity cultivars the *GmFAD2-1A* gene showed higher expression pattern in initial and middle stages of maturation. In the same manner as for the *BC* gene, the *GmFAD2-1A* gene expression was almost null in the mature seed for all cultivars. In general, the correlation between the pattern of *BC* and *GmFAD2-1A* genes expression in the late maturity cultivars showed that at stages where there were a higher rate of *GmFAD2-1A* gene transcription the expression of *BC* gene decreased after to reach a peak of expression in third stage. However, the *BC* gene expression was still higher than the *GmFAD2-1A* gene at these stages. Thus, for the late maturity cultivars, at stages where the *GmFAD2-1A* gene showed the highest expression

values can be suggested that the pBC promoter is active or it is with a maximum capacity to activate the target gene transcription. In early maturity cultivars this correlation showed that the *BC* and *GmFAD2-1A* genes presented a similar expression pattern, with high levels of genes expression in initial and middle stages of maturation (2nd and 3rd), decreasing in later stages of seed development. Therefore, it can be suggested that the highest pBC promoter activity occurred in the same stages where the highest values of *GmFAD2-1A* gene expression were found. Thus, it can be suggested that the promoter of the β -conglycinin α subunit gene presents a high potential to be used in future experiments of genetic transformation which has as goal to silence the *GmFAD2-1A* gene during the soybean seed development in all cultivars analysed.

1- INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) constitui um dos produtos agrícolas de maior importância para o agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país. De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção nacional de grãos de soja foi de 65,16 milhões de toneladas na safra 2009/10 (levantamento feito em janeiro de 2010), representando um aumento de 14%, aproximadamente 8,0 milhões de toneladas, em relação à safra 2008/09 (CONAB, 2010). A importância e o alto valor agregado desse produto agrícola devem-se principalmente ao fato da semente dessa leguminosa ser uma excelente fonte de proteínas e lipídios para a alimentação humana e animal.

O óleo de soja é o líder mundial dos óleos vegetais em termos de produção e de consumo. De acordo com a ABIOVE (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais), no período de fevereiro a dezembro de 2009, o Brasil produziu aproximadamente 4,8 milhões de toneladas de óleo de soja, com cerca de 1,36 milhões de toneladas destinados à exportação (ABIOVE, 2010).

O óleo de soja derivado de sementes de variedades comerciais, em geral, apresenta em sua composição níveis de ácidos graxos polinsaturados elevados, em torno de 61% (Yadav, 1996). Estes altos níveis de polinsaturação tornam o óleo de soja susceptível à clivagem oxidativa das duplas ligações nas moléculas de ácidos graxos polinsaturados, em condições de aquecimento e exposição ao oxigênio do ar, com produção de compostos voláteis, especialmente aldeídos de cadeia curta, hidroperóxidos e ceto derivados. Este processo característico de deterioração é popularmente conhecido como rancificação e pode ser identificado pelo gosto e cheiro desagradáveis do óleo (Yadav, 1996; Wang e Hildebrand, 1988). Deste modo, espera-se que óleos menos susceptíveis à oxidação, contendo teores reduzidos de ácidos graxos polinsaturados, apresentem uma maior aceitação na indústria de alimentos e assim adquiram um maior valor comercial.

Uma alternativa eficiente para obtenção de óleos de soja menos susceptíveis à degradação oxidativa é a modificação da fração lipídica da semente de soja, através do desenvolvimento de novos cultivares com teores reduzidos de ácidos graxos polinsaturados na semente por meio de técnicas de transformação genética de plantas

(Wang e Hildebrand, 1988; Kinney, 1996; Liu *et al.*, 2002). Uma estratégia promissora para a obtenção de plantas transgênicas que produzam sementes com composição lipídica alterada, apresentando teores de ácido linoléico (C18:2 $\Delta^{9,12}$) e linolênico (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$) reduzidos e teores de ácido oléico (C18:1 Δ^9) aumentados, é o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) de genes que codificam para enzimas dessaturases. Essas enzimas são responsáveis por catalisarem a introdução de duplas ligações na porção hidrocarbônica dos ácidos graxos, produzindo, dessa forma, ácidos graxos polinsaturados (Kinney *et al.*, 2002). Grande destaque pode ser dado para a enzima oleoil-CoA dessaturase (ω -6 dessaturase) plastidial e microssomal, que introduz uma insaturação no ácido oléico para produção do ácido linoléico. O silenciamento do gene que codifica para essa enzima permite a obtenção de óleos de soja com elevados teores de ácido oléico e reduzidos níveis de ácidos linoléico e linolênico.

Para que ocorra o PTGS, a sequência correspondente ao gene que codifica para uma enzima dessaturase, ou parte dessa sequência, deve ser inserida no genoma da planta de tal forma que a sua transcrição leve à formação de uma molécula de RNA fita dupla (dsRNA). Ao final do PTGS irá ocorrer a degradação de mRNAs do gene alvo endógeno, impedindo a síntese da proteína correspondente, neste caso uma enzima da via de biossíntese de ácidos graxos polinsaturados, alterando assim a composição de ácidos graxos presentes na fração óleo (Kinney *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Uma vez que o óleo é produzido a partir da semente de soja esse silenciamento deve ocorrer especificamente na semente, de forma a não alterar as características agronômicas da planta transgênica e não interferir negativamente no seu crescimento e desenvolvimento. Para isso, deve-se fazer uso de um promotor semente-específico durante a construção do cassete de expressão que será usado no PTGS, sendo que esse promotor dirigirá a expressão do transgene apenas na semente de soja, garantindo o silenciamento exclusivamente nesse órgão da planta. Sequências regulatórias de genes que codificam para proteínas de reserva em sementes representam uma valiosa fonte de promotores que podem ser usados para dirigir a expressão de transgenes de maneira semente-específica. Promotores de genes da β -conglícinina de soja, principalmente o promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina, são exemplos de alguns dos promotores semente-específicos melhor estudados em dicotiledôneas (Chen *et al.*, 1989). A

β -conglícinina é um dos principais componentes protéicos armazenados em sementes de soja, sendo uma proteína trimérica composta de três subunidades principais: α , α' e β (Yoshino *et al.*, 2001).

No presente trabalho, através da técnica de PCR em Tempo Real (qRT-PCR), foi possível analisar o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A*, que codifica a enzima ω -6 dessaturase microssomal de soja, e o padrão de expressão do gene que codifica a subunidade α da β -conglícinina (gene *BC*), ao longo do desenvolvimento da semente de soja em 5 diferentes variedades, possibilitando correlacionar o padrão de expressão desses dois genes. Através dessa correlação e com base em resultados publicados na literatura (Yoshino *et al.*, 2006 e Imoto *et al.*, 2008), foi possível analisar se o promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina (promotor pBC) apresenta potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética de soja que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A*, o que resultaria na produção de óleos de soja com maior estabilidade oxidativa.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Melhoramento genético de plantas e composição lipídica da semente de soja

A capacidade de produzir vegetais transgênicos acelerou o progresso de muitas áreas da biologia celular vegetal, abrindo muitas possibilidades na agricultura. Com a utilização dessa nova tecnologia tornou-se possível modificar a qualidade de lipídios, amido e proteínas armazenadas em sementes e conferir a determinados vegetais resistência a fungos, vírus e insetos ou tolerância a herbicidas (Dunwell, 2000). A liberação de plantas transgênicas para o cultivo e para o consumo humano e animal atrai cada vez mais a atenção das pessoas, sendo um dos temas que predominam nas discussões científicas, éticas, econômicas e políticas na atualidade (Nodari e Guerra, 2001).

Na transgenia, sequências de DNA (genes) podem ser removidas de um organismo, modificadas ou não, ligadas à outras sequências, incluindo as regulatórias, e inseridas em outros organismos. A fonte destes genes pode ser qualquer organismo vivo (microrganismo, planta, animal) ou vírus. Assim, por exemplo, a Soja RR transgênica resistente ao *Roundup*, herbicida à base de glifosato, contém material genético de pelo menos quatro diferentes organismos: vírus do mosaico da couve-flor, petúnia e dois derivados de *Agrobacterium*. Desta forma, a transformação genética possibilita uma alternativa de introdução de genes em plantas, representando uma ferramenta a mais à disposição do melhoramento genético (Nodari e Guerra, 2001).

Dentre as lavouras geneticamente modificadas mais comercializadas em escala mundial, a soja é a que mais se destaca. A soja constitui um bom alvo para o melhoramento genético via transformação por representar uma cultura de grande interesse econômico, sendo um dos principais produtos brasileiros de exportação e por constituir uma importante fonte de óleo e proteína. Modificações usando técnicas de Engenharia Genética podem facilitar o rápido desenvolvimento de novas variedades com características como resistência a herbicidas e doenças e melhoramento da qualidade do óleo e teor de proteína.

Os óleos vegetais são constituídos principalmente por triacilgliceróis, que apresentam três moléculas de ácidos graxos esterificadas aos grupos hidroxilas dos três

carbonos da molécula de glicerol. O conteúdo médio dos ácidos graxos constituintes do óleo de soja de variedades comerciais é de 11% de ácido palmítico (C16:0), 4% de ácido esteárico (C18:0), 24% de ácido oléico (C18:1 Δ^9), 54% de ácido linoléico (C18:2 $\Delta^{9,12}$) e 7% de ácido linolênico (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$), sendo que os ácidos graxos polinsaturados perfazem um total de cerca de 61%, o que excede o requerimento diário humano (Yadav, 1996).

A composição e a distribuição desses ácidos graxos da molécula de triacilglicerol determinam a qualidade do óleo, o valor nutricional, o sabor e a estabilidade oxidativa. Nutricionalmente, os óleos com alto teor de ácidos graxos polinsaturados apresentam efeitos benéficos, uma vez que vários estudos relatam que ambos, ácidos graxos mono e polinsaturados, reduzem a concentração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no plasma sanguíneo, diminuindo a probabilidade de ocorrência de doenças cardiovasculares (McNamara, 1992; Woollett e Dietschy, 1994; Gardner e Kraemer, 1995; Katan *et al.*, 1995b). Entretanto, a exposição desses óleos à altas temperaturas por longos períodos de tempo leva à quebra oxidativa das duplas ligações de carbono, resultando na formação de aldeídos de cadeia curta, hidroperóxidos e ceto derivados. Estes compostos voláteis de baixo peso molecular produzem sabor desagradável, rancidez e reduzido desempenho de fritura do óleo. Por isso o alto teor de ácidos graxos polinsaturados tem sido correlacionado com a redução da estabilidade oxidativa e da qualidade (sabor e odor) do óleo de soja (Yadav, 1996; Wang e Hildebrand, 1988; Warner *et al.*, 2001; Kinney, 2003). Segundo Abbadi *et al.* (2004), o teor de ácidos graxos altamente insaturados pode ser reduzido a valores muito menores do que os naturalmente encontrados sem que haja prejuízo com relação aos requerimentos nutricionais. Dessa forma, uma redução no teor de ácidos graxos polinsaturados acarretaria em um aumento da estabilidade do óleo e, conseqüentemente, aumentaria o seu valor comercial (Flores *et al.*, 2008).

Por isso, com o objetivo de melhorar a qualidade e a estabilidade oxidativa do óleo de soja, ele passa por um processo chamado de hidrogenação seletiva no qual as duplas ligações de carbono são reduzidas a ligações simples (Woerfel, 1995). Tal processo reduz o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, principalmente linoléico e linolênico, e aumenta a abundância relativa do ácido graxo monoinsaturado oléico.

Porém, a hidrogenação resulta em óleos ricos em ácidos graxos *trans*, cujo consumo está associado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, muitas vezes por aumentarem as taxas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no plasma sanguíneo (Mensink e Katan, 1990; Mensink *et al.*, 1994; Ascherio e Willett, 1995; Katan *et al.*, 1995a; Kishore *et al.*, 2007). Óleos de soja usados em saladas não são hidrogenados, mas são ricos em ácido palmítico, que também está associado com doenças do coração (Mcnamara, 1992; Allison *et al.*, 1995). A maioria dos estudos relatam que o ácido esteárico apresenta um efeito neutro na concentração de LDL no plasma, enquanto os ácidos palmítico, mirístico (C14:0) e láurico (C12:0) parecem aumentar essa concentração (Mensink *et al.*, 1994; Woollett e Dietschy, 1994).

Existe, portanto, um amplo consenso de que a substituição dos ácidos graxos saturados, tais como o ácido palmítico, por ácidos graxos insaturados no óleo de soja é, de fato, uma característica altamente desejável. Como os ácidos graxos polinsaturados diminuem a estabilidade oxidativa e a qualidade do óleo, torna-se interessante produzir óleos com alto teor do ácido graxo monoinsaturado oléico, que são óleos altamente resistentes à oxidação e que contribuem para a diminuição nos níveis de colesterol no sangue (American Society of Clinical Nutrition, 1996; Anai *et al.*, 2008). Isso pode ser obtido com o uso da biotecnologia, produzindo óleos de soja livres de ácidos graxos *trans*, ricos em ácidos graxos monoinsaturados e com reduzido teor de ácido palmítico, apresentando, dessa forma, atributos nutricionais e funcionais desejáveis (Wang e Hildebrand, 1988; Osório *et al.*, 1995; Kinney, 1996; Bruner *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; McNamara, 1992; Gardner e Kraemer, 1995; Katan *et al.*, 1995b).

As enzimas dessaturases catalisam a introdução de duplas ligações na porção hidrocarbônica das moléculas de ácidos graxos, catalisando assim a síntese de ácidos graxos polinsaturados. Dessa forma, grande parte dos esforços para manipular as propriedades de óleos de plantas tais como soja, milho e canola têm sido direcionados para a manipulação da expressão de genes que codificam para essas enzimas (Voelker e Kinney, 2001). Existem vários métodos para silenciar efetivamente genes para dessaturases em plantas transgênicas, com grande destaque para o silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (Kinney, 2002).

Óleos de soja com um conteúdo total de ácidos graxos polinsaturados menor do que 5% e com aproximadamente 85% de ácido oléico foi produzido por silenciamento do gene *GmFAD2-1*, que codifica para a enzima ω -6 dessaturase microsomal responsável por catalisar a síntese do ácido linoléico a partir do ácido oléico. Esse óleo também apresentou um conteúdo de ácido palmítico de cerca de 7%, comparado com 11% no óleo comercial. A razão para redução no nível de ácido palmítico não é inteiramente conhecida, mas ela pode ser causada pela competição por substratos comuns, palmitoil-CoA e oleoil-CoA, por uma classe de enzimas aciltransferases que são capazes de transferir ou um ou outro desses substratos para a molécula de glicerol, para formar os triacilgliceróis. Dessa forma, um grande aumento no *pool* de oleoil-CoA devido ao silenciamento do gene *GmFAD2-1* poderia resultar em uma redução na utilização do palmitoil-CoA como substrato para a síntese de triacilgliceróis, o que resultaria em uma conseqüente diminuição no conteúdo de ácido palmítico no óleo de soja (Kinney, 1996; Kinney, 1995).

A estabilidade do óleo com alto teor de ácido oléico é similar a do óleo completamente hidrogenado. Isso indica que esse óleo pode ter sua “vida de prateleira” aumentada sem a necessidade da adição de antioxidantes (Kinney, 1996). Surpreendentemente, óleos de soja com alto teor de ácido oléico apresentam uma estabilidade oxidativa três a quatro vezes maior do que aquela dos óleos de outras espécies modificadas geneticamente, como canola e girassol, os quais têm uma composição de ácidos graxos muito similar à do óleo de soja com alto teor de ácido oléico. Além disso, a comercialização de sojas transgênicas com alto conteúdo de ácido oléico tem demonstrado que é possível alterar a composição de ácidos graxos da semente de soja sem afetar o rendimento ou a sensibilidade ambiental da planta (Kinney, 2002).

2.2- Genes que codificam para enzimas ω -6 dessaturases microsomais de soja

Em soja, a biossíntese de ácidos graxos insaturados é catalisada por enzimas denominadas ácido graxo dessaturases. O processo de dessaturação ocorre no plastídio e retículo endoplasmático da célula vegetal (Ohlrogge e Browse, 1995). A primeira reação de dessaturação é catalisada pela estearoil-CoA dessaturase plastidial para produzir o

ácido oléico (18:1 Δ^9). A partir deste, são produzidos os ácidos graxos polinsaturados por meio de sucessivas dessaturações. A primeira delas é catalisada pela oleoil-CoA dessaturase (ω -6 dessaturase) plastidial e microssomal, que introduz uma insaturação no ácido oléico para produção do ácido linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$). Uma nova insaturação é introduzida pela linoleil-CoA dessaturase (ω -3 dessaturase) plastidial e microssomal no ácido linoléico para a produção do ácido linolênico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) (Heppard *et al.*, 1996).

Nas plantas, a rota primária para a produção de ácidos graxos polinsaturados é a reação catalisada pela oleoil-CoA dessaturase (ω -6 dessaturase). Segundo Heppard *et al.* (1996), em soja, a enzima ω -6 dessaturase microssomal é codificada por dois genes: *GmFAD2-1* e *GmFAD2-2*. Esses pesquisadores verificaram que, no cultivar de soja Rye, o gene *GmFAD2-1* é expresso durante o desenvolvimento da semente, quando a taxa de síntese de lipídios de reserva é máxima. O gene *GmFAD2-2* é constitutivamente expresso em tecidos vegetativos e durante todo o desenvolvimento da semente, embora seu maior nível de expressão tenha sido detectado em folhas. Esses resultados fornecem a evidência molecular de que a dessaturação do ácido oléico em sementes de soja é principalmente devido à expressão do gene *GmFAD2-1*. A enzima ω -6 dessaturase microssomal codificada pelo gene *GmFAD2-2* parece ser responsável pela produção do ácido linoléico que compõem os lipídios de membrana. A enzima codificada pelo gene *GmFAD2-1* parece ter um papel principal no controle da conversão do ácido oléico em ácido linoléico para compor os lipídios de reserva durante o desenvolvimento da semente, uma vez que o nível de expressão do gene *GmFAD2-1* é muito superior ao do gene *GmFAD2-2* durante o período de biossíntese e acúmulo dos lipídios de reserva (Heppard *et al.*, 1996). Dessa forma, pode-se dizer que em sementes de soja a maioria do ácido linoléico é produzido pela atividade da ω -6 dessaturase microssomal que é codificada pelo gene *GmFAD2-1*. Somente uma pequena quantidade (~5%) é derivada de uma via separada no plastídio (ω -6 dessaturase plastidial/gene *GmFAD6*) e uma quantidade insignificante é obtida a partir da atividade da ω -6 dessaturase microssomal que é codificada pelo gene constitutivo *GmFAD2-2*.

Alterações na composição de ácidos graxos dependentes da temperatura é um fenômeno comumente observado na natureza. Em organismos que produzem ácidos graxos polinsaturados existe tipicamente uma relação inversa entre o acúmulo de ácidos

graxos polinsaturados nos lipídios de membrana e a temperatura de crescimento: o crescimento em baixas temperaturas leva a um aumento nos níveis de ácidos graxos polinsaturados, tais como o ácido linoléico, e uma diminuição nos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, tais como o ácido oléico (Thomas *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2005). Essas alterações no conteúdo de ácidos graxos polinsaturados nas membranas celulares ajudam a manter níveis apropriados de fluidez, e então auxiliam na sobrevivência da célula em uma ampla faixa de temperaturas. A mesma relação inversa entre o acúmulo de ácidos graxos polinsaturados e temperatura é também observado em lipídios de reserva de sementes produtoras de óleos, tais como soja, girassol e canola. Em soja, o crescimento em altas temperaturas coincide com uma diminuição nas concentrações dos ácidos linoléico e linolênico nos triacilgliceróis da semente e um conseqüente aumento nos níveis de ácido oléico (Rebetzke *et al.*, 1996).

Heppard *et al.* (1996) em um estudo que analisava a expressão dos genes *GmFAD2-1*, *GmFAD2-2* e *GmFAD6* sob influência da temperatura (32/28°C, 28/22°C, 22/18°C e 18/12°C) mostraram que, em sementes e folhas de soja, os níveis dos ácidos linoléico e linolênico aumentaram gradualmente com a diminuição da temperatura. Entretanto, tal evento não foi acompanhado por um aumento nos níveis de transcritos dos genes *GmFAD2-1*, *GmFAD2-2* e *GmFAD6*. Esses resultados demonstram que os níveis elevados de ácidos graxos polinsaturados em sementes de soja cultivadas em baixa temperatura não são devido a um aumento na expressão desses genes. Mecanismos regulatórios, tais como modificações traducionais e pós-traducionais da enzima ω -6 dessaturase, podem estar associados com o aumento observado nos níveis de ácido linoléico nessas condições (Heppard *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos por Heppard *et al.* (1996) também sugerem que existem pelo menos duas cópias de cada gene *GmFAD2-1* e *GmFAD2-2* no genoma de soja, o que é consistente com a natureza tetraplóide desse genoma.

Por sua vez, Tang *et al.* (2005), em estudos mais recentes, identificaram a presença de dois genes *GmFAD2-1* altamente relacionados, porém distintos, no genoma de soja. Eles foram designados *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B*. O gene *GmFAD2-1A* é idêntico à sequência relatada por Heppard *et al.* (1996). *GmFAD2-1B* possui, aproximadamente, 93,8% de identidade na sua sequência de nucleotídeos e aminoácidos

quando comparado com *GmFAD2-1A*, diferindo em somente 24 resíduos de aminoácidos. Ambos, *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B*, têm aproximadamente 67% de identidade com a sequência de DNA do gene *GmFAD2-2* (Tang *et al.*, 2005) e aproximadamente 73% de identidade em relação à sequência de aminoácidos (Heppard *et al.*, 1996).

Tang *et al.* (2005) concluíram que os genes *GmFAD2-1* (*GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B*) são expressos em sementes em desenvolvimento e *GmFAD2-2* apresenta expressão constitutiva, resultados que estão de acordo com os obtidos por Heppard *et al.* (1996). O gene *GmFAD2-1B*, entretanto, é provável de ser mais altamente expresso que o gene *GmFAD2-1A* nas sementes em desenvolvimento. Porém, análises *in silico* das ESTs de *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* sugerem que ambos os genes sejam ativamente expressos durante o desenvolvimento da semente de soja.

Análises de expressão em levedura dos dois genes *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* revelaram que as principais diferenças entre as duas isoformas da enzima ω -6 dessaturase microssomal codificadas por esses genes estão na estabilidade e/ou atividade dessas enzimas, particularmente em resposta ao aumento na temperatura de crescimento da planta, de tal modo que a isoforma codificada pelo gene *GmFAD2-1A* é relativamente mais instável em altas temperaturas do que a codificada pelo gene *GmFAD2-1B*. Entretanto, ambas as isoenzimas contribuem para a qualidade final do óleo de soja (Tang *et al.*, 2005).

Em estudos realizados por Li *et al.* (2007), utilizando o cultivar de soja Meng8206, foi isolado um novo gene que codifica uma isoforma da enzima ω -6 dessaturase microssomal, designado *GmFAD2-3*. Estudos de análise de expressão mostraram que o gene *GmFAD2-3* foi expresso em sementes em desenvolvimento e em todos os outros tecidos analisados (caule, raiz e folha) sugerindo que esse gene apresenta expressão constitutiva. O alinhamento da sequência correspondente ao gene *GmFAD2-3* com a sequência do gene *GmFAD2-2* isolada por Heppard *et al.* (1996) mostrou aproximadamente 95% de identidade entre suas sequências de nucleotídeos e aminoácidos, sendo que o gene *GmFAD2-3* codifica para a enzima que parece ser responsável pela produção de ácido linoléico que compõem os lipídios de membrana. Em concordância com resultados obtidos anteriormente, também observou-se que a

diminuição na temperatura de crescimento (32/28°C, 28/22°C, 18/12°C e 12/8°C) não alterou os níveis de transcritos dos genes *GmFAD2-2* e *GmFAD2-3*.

Schlueter *et al.* (2007), por sua vez, identificaram a presença de cinco membros da família de genes *GmFAD2* no genoma de soja: *GmFAD2-1A*, *GmFAD2-1B*, *GmFAD2-2A*, *GmFAD2-2B* e *GmFAD2-2C*. Com base nos alinhamentos das ESTs, *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* mostraram evidência de produção de transcritos resultantes de *splicing* alternativo. Para ambos os genes, os transcritos de *splicing* alternativo movem o códon de início da metionina por aumento ou diminuição do tamanho do íntron. Esse evento, entretanto, não altera a proteína resultante. Esses transcritos foram denominados *GmFAD2-1A_S* e *GmFAD2-1A_L* para eventos de *splicing* alternativo que envolvem um pequeno (S) ou grande (L) íntron, respectivamente. A mesma terminologia se aplica ao gene *GmFAD2-1B* (Schlueter *et al.*, 2007).

Schlueter *et al.* (2007), através de análises por RT-PCR, verificaram a expressão dos genes da família *GmFAD2* em sementes em desenvolvimento e tecidos vegetativos (raízes e folhas) do cultivar de soja Williams 82. Não houve amplificação do gene *GmFAD2-2A* nas amostras, sugerindo que esse gene não é expresso nos tecidos analisados ou que esse gene não é funcional. A análise de expressão dos genes *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* mostrou que nenhum deles teve expressão aumentada em sementes em desenvolvimento em condições de baixa temperatura, confirmando resultados prévios (Heppard *et al.*, 1996). O que foi surpreendente foi a amplificação de *GmFAD2-1A_L* e *GmFAD2-1B_S* em tecidos vegetativos, quando os genes que dão origem a esses transcritos foram originalmente mostrados expressar somente em sementes em desenvolvimento (Heppard *et al.*, 1996). O gene *GmFAD2-2B*, de acordo com resultados anteriores obtidos por Heppard *et al.* (1996), foi expresso em todos os tecidos analisados e *GmFAD2-2C* apresentou um padrão de expressão muito similar ao do *GmFAD2-2B* (Schlueter *et al.*, 2007). Análises de qRT-PCR foram realizadas com o objetivo de procurar por diferenças na mudança de expressão dos genes *GmFAD2* em sementes em desenvolvimento de plantas cultivadas em alta (32/28°C) e baixa temperatura (18/12°C). O gene *GmFAD2-2C* foi o único que mostrou significativo aumento nos níveis de transcritos em sementes em desenvolvimento em baixas temperaturas, com um aumento de até oito vezes no nível de expressão. Então,

GmFAD2-2C é o mais provável gene candidato para o aumento no *pool* de enzimas ω -6 dessaturases microsossomais em baixas temperaturas, levando a um aumento no teor de ácido linoléico. Esse gene, entretanto, não foi o único que apresentou mudanças no acúmulo de transcritos dependente de temperatura. Ambos, *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* (e seus respectivos transcritos resultantes de *splicing* alternativo) mostraram significativo aumento no acúmulo de transcrito em sementes em desenvolvimento em condições de alta temperatura de crescimento. Esses resultados são similares àqueles obtidos por Heppard *et al.* (1996). Esse aumento na expressão gênica pode ser devido à instabilidade da enzima ω -6 dessaturase codificada pelos genes *GmFAD2-1* em altas temperaturas (Heppard *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2005).

Ainda mais recentemente, Anai *et al.* (2008), em estudos realizados utilizando o cultivar de soja Bay, também identificaram a presença de alguns membros da família de genes *GmFAD2*: *GmFAD2-1A*, *GmFAD2-1B*, *GmFAD2-2A* e *GmFAD2-2B*. *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* foram predominantemente expressos em sementes em desenvolvimento. O gene *GmFAD2-2A* foi moderadamente expresso em vários tecidos. Transcritos do gene *GmFAD2-2B* não foram detectados em nenhum tecido, sugerindo que este gene não é expresso nesses tecidos ou não é funcional. Esses resultados são contrários àqueles obtidos por Schlueter *et al.* (2007), embora em ambos os casos apenas um gene, *GmFAD2-2A* (Anai *et al.*, 2008) ou *GmFAD2-2B* (Schlueter *et al.*, 2007), tenha sido expresso ou se mostrado funcional nos tecidos analisados. Além da similaridade nos perfis de expressão dos genes *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B*, as ORFs desses genes foram 95,4% idênticas no nível de nucleotídeos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Tang *et al.* (2005) e sugerem que *GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B* sejam genes resultantes de um evento de duplicação, altamente relacionados, porém distintos, que codificam para as principais isoenzimas ω -6 dessaturases microsossomais que participam da biossíntese de lipídios de reserva em sementes de soja em desenvolvimento, sendo portanto alvos atrativos para o melhoramento genético de soja.

Dessa forma, de acordo com os resultados relatados por Heppard *et al.* (1996), Tang *et al.* (2005), Li *et al.* (2007), Schlueter *et al.* (2007) e Anai *et al.* (2008), pode-se dizer que vários genes *GmFAD2* diferentes codificam para enzimas ω -6 dessaturases

microssomais em soja, embora nem todos tenham se mostrado funcionais: *GmFAD2-1A*, *GmFAD2-1B*, *GmFAD2-2A*, *GmFAD2-2B*, *GmFAD2-2C* e *GmFAD2-3*.

O alto nível de ácidos graxos polinsaturados pode ser requerido para manter a fluidez da membrana e a atividade de enzimas ligadas à membrana durante os processos de divisão e diferenciação celular nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente. A grande maioria dos ácidos graxos sintetizados durante esses estádios são usados para a biossíntese de membranas. Significante alteração na composição de ácidos graxos durante os estádios iniciais de desenvolvimento da semente pode afetar a sobrevivência da planta em baixas temperaturas. Entretanto, uma expressão reduzida de genes que codificam para ω -6 dessaturases microssomais somente durante o período de síntese de lipídios de reserva em plantas transgênicas pode gerar plantas agronomicamente viáveis e com características funcionais e nutricionais desejáveis, como alto teor de ácido oléico na semente. Isso pode ser obtido através do silenciamento específico de genes *GmFAD2-1* (*GmFAD2-1A* e *GmFAD2-1B*), sem alterar dessa forma o nível de expressão dos genes *GmFAD2-2* e a conseqüente síntese de ácidos graxos polinsaturados que compõem os lipídios de membrana (Heppard *et al.*, 1996).

2.3- Importância dos promotores tecido/órgão-específicos e de seus *cis*-elementos na transformação genética de plantas

A transformação genética de plantas é uma ferramenta poderosa que tem permitido o desenvolvimento de cultivares com qualidade nutricional melhorada ou com capacidade de síntese de compostos de interesse farmacêutico ou industrial. Apesar dos potenciais benefícios advindos desta tecnologia, ainda há muitos questionamentos relativos à segurança dos consumidores e do meio ambiente. Para minimizar possíveis efeitos adversos das plantas geneticamente modificadas, a expressão do transgene deve ser fortemente regulada, tanto temporalmente quanto espacialmente. A expressão de genes sob o controle de promotores adequados pode constituir parte da resposta para a questão sobre a segurança em relação às plantas geneticamente modificadas (Potenza *et al.*, 2004). Além disso, o baixo nível de expressão de genes exógenos em plantas transgênicas é um fator chave que também limita a engenharia genética de plantas. Devido à atividade regulatória crítica dos promotores na transcrição dos genes, eles são

estudados amplamente para melhorar a eficiência do sistema de plantas transgênicas (Qinggele *et al.*, 2007). A seleção do promotor tem se tornado, portanto, cada vez mais importante para o sucesso na transferência do gene e expressão do transgene em plantas (Dale *et al.*, 2002).

Promotores são regiões do DNA que estão localizados *upstream* (5') da região codificante de um gene e que contêm sequências específicas que são reconhecidas por proteínas envolvidas com o início da transcrição, tais como a enzima RNA polimerase e fatores de transcrição. Os promotores são importantes no controle de todo o perfil de expressão do gene, ou ativando ou reprimindo a transcrição em tempos e locais apropriados. Ao longo dos anos, vários promotores foram isolados, caracterizados e aplicados em experimentos de transformação genética de plantas (Potenza *et al.*, 2004).

A escolha do promotor a ser utilizado em uma construção depende fundamentalmente dos objetivos aos quais se quer atingir. Muitas vezes é desejável a utilização de promotores que conferem uma expressão temporal ou tecido/órgão-específica, mas promotores que dirigem uma expressão constitutiva e em altos níveis têm sido uma poderosa ferramenta na engenharia genética de plantas. O promotor mais comumente usado para este fim, tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (Battraw e Hall, 1990; Benfey *et al.*, 1990), é o promotor CaMV 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Ele é usado com o objetivo de se obter uma super-expressão constitutiva do transgene e apresenta uma alta expressão em praticamente todas as regiões da planta transgênica (Potenza *et al.*, 2004). Uma desvantagem do uso de promotores de origem viral em uma construção para transformação de plantas é que essa sequência poderia ser reconhecida como “invasora” e inativada (Elmayan e Vaucheret, 1996) por meio de um mecanismo conhecido por silenciamento gênico transcricional (TGS) desencadeado pela metilação do DNA e formação de heterocromatina (Scheid *et al.*, 2002). É impossível prever se haverá ou não o silenciamento do gene, mas quando ocorre ele pode diminuir a atividade gênica em toda a planta ou afetar a especificidade dos promotores (Kloti *et al.*, 2002).

Por sua vez, uma desvantagem do uso de promotores constitutivos é que eles continuamente expressam os genes que estão sob seu controle durante toda a vida e em todos os tecidos da planta. Isso, além de ser anti-econômico em termos energéticos para

a planta, também é prejudicial e freqüentemente afeta suas características agronômicas. Se um transgene específico é super-expresso em tempo errado durante o desenvolvimento, nos tecidos onde ele não é normalmente expresso, ou em níveis muito altos, isso pode ter consequências inesperadas no crescimento e desenvolvimento da planta e, potencialmente, no meio ambiente.

Promotores de plantas que ativam a transcrição dos genes somente onde e quando eles são necessários podem ser ideais para estratégias de engenharia genética (Potenza *et al.*, 2004; Tang e Galili, 2004). Como exemplo, podem-se citar os promotores semente-específicos que somente expressam os genes que estão sob seu controle nas sementes em desenvolvimento, não ocorrendo expressão gênica em outros órgãos ou tecidos (Quinggele *et al.*, 2007). Por isso, o isolamento e a utilização de promotores que dirijam uma expressão temporal ou tecido/órgão-específica são importantes para o desenvolvimento de cultivares transgênicos com uma expressão controlada do transgene e que possuem uma maior aceitação do público alvo.

Muito da “sintonia fina” da expressão de um gene é controlada por fatores de transcrição ou proteínas que se ligam aos *cis*-elementos, também chamados elementos regulatórios. A importância dos *cis*-elementos na regulação da expressão gênica pode ser confirmada através dos resultados obtidos por Keller e Baumgartner (1991). Esses autores identificaram a presença de quatro *cis*-elementos no promotor GRP 1.8 do feijão francês como sendo os responsáveis por controlarem a expressão específica do gene repórter *GUS* (β -glucuronidase) em células vasculares de plantas transgênicas de tabaco. Um desses *cis*-elementos, denominado “elemento regulatório negativo”, foi considerado essencial para a expressão vascular-específica, uma vez que a sua deleção resultou em expressão do gene *GUS* em outros tipos de células além das células vasculares.

A expressão semente-específica de transgenes tem sido usada para aumentar a qualidade nutricional e funcional de grãos (Shintani e DellaPenna, 1998; Goto *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000; Barro *et al.*, 1997). Como exemplo, faz-se referência aos experimentos realizados por Goto *et al.* (1999) e Barro *et al.* (1997). Com o objetivo de melhorar o conteúdo de ferro em sementes de arroz, Goto *et al.* (1999) transferiram a sequência codificante inteira do gene da ferritina de soja para *Oryza sativa*. O promotor endosperma-específico do gene da glutelina (gene *GluB-1*), que é uma proteína de

reserva em sementes de arroz, foi usado para dirigir a expressão do gene da ferritina, fazendo com que essa expressão fosse tecido-específica. Esse gene foi altamente expresso no endosperma das plantas transgênicas, o que foi confirmado por um aumento de aproximadamente três vezes no conteúdo de ferro nas sementes dessas plantas. Além disso, o teor de ferro em outros órgãos como folha, caule e raiz foi similar entre as plantas de arroz transgênicas e selvagens, indicando uma expressão semente-específica. Estudos mostram que a ferritina é usada por plantas e animais como uma forma de armazenamento de ferro (Beard *et al.*, 1996). Logo, os resultados encontrados por Goto *et al.* (1999) sugerem que o aumento no conteúdo de ferritina em cereais feito por engenharia genética pode ajudar a resolver o problema da deficiência de ferro na dieta humana. Barro *et al.* (1997), por sua vez, transformaram plantas de trigo com um cassete de expressão que continha o gene que codifica para subunidades de alto peso molecular (HMW) da proteína glutenina sob controle do promotor endosperma-específico desse próprio gene. A expressão dos genes *1Ax1* e *1Dx5*, que codificam para essas subunidades, foi restrita ao grão de trigo, não ocorrendo em outros órgãos. O aumento nas proporções das subunidades HMW na semente melhorou as propriedades funcionais da farinha obtida a partir da linhagem de trigo transformada.

Em plantas produtoras de grãos, genes que codificam para proteínas de reserva são altamente expressos durante o desenvolvimento da semente e os promotores desses genes, incluindo seus *cis*-elementos, foram isolados e caracterizados para serem utilizados em experimentos de engenharia genética. Em dicotiledôneas, os promotores semente-específicos mais utilizados são o promotor do gene da β -faseolina do feijão francês (Bustos *et al.*, 1989) e os promotores dos genes da β -conglícinina de soja (Chen *et al.*, 1989), uma das proteínas de reserva mais abundantes na semente de soja (Yoshino *et al.*, 2001). A expressão de genes que codificam para proteínas de reserva em sementes é regulada espacial e temporalmente durante a embriogênese (Perez-Grau e Goldberg, 1989). Ambos os processos transcricional e pós-transcricional estão envolvidos na regulação (Walling *et al.*, 1986). Além disso, múltiplos eventos celulares incluindo translocação, processamento, enovelamento, montagem e empacotamento das proteínas ocorrem subsequentes à sua síntese; dessa forma, a regulação desses eventos pode também afetar o acúmulo da proteína. Em embriões, mRNA e/ou proteína estão

algumas vezes presentes em diferentes níveis em tipos diferentes de células, tais como em células dos cotilédones e eixo embrionário. Embora fatores *cis*-ativos (Bustos *et al.*, 1991) e *trans*-ativos (Nambara *et al.*, 1995) envolvidos no controle da transcrição embrião-específica já tenham sido identificados, pouco é conhecido sobre os mecanismos que governam a relação entre a diferenciação dentro dos tipos de células no embrião e o acúmulo de proteínas (Imoto *et al.*, 2008).

2.4- Proteína β -conglícinina da semente de soja

A soja contém duas principais classes de proteínas de reserva em sementes, β -conglícinina (proteínas 7S) e glicíninas (proteínas 11S), que são em grande parte responsáveis pelas propriedades nutricionais e físico-químicas da soja (Maruyama *et al.*, 2001). Juntas, a β -conglícinina e a glicínina representam cerca de 70-80% das proteínas totais presentes na semente de soja (Natarajan *et al.*, 2006; Natarajan *et al.*, 2007). A β -conglícinina é uma proteína trimérica (Yoshino *et al.*, 2001) glicosilada (Harada *et al.*, 1989), com uma massa molecular de 150-200 kDa (Maruyama *et al.*, 1998; Hou e Chang, 2004), composta por três subunidades principais, α , α' e β (Yoshino *et al.*, 2001), que possuem massas moleculares de ~72 kDa, ~76 kDa e ~52-54 kDa, respectivamente (Coates *et al.*, 1985) e constitui ~30-35% do total de proteínas da semente (Harada *et al.*, 1989; Higgins, 1984; Hou e Chang, 2004). As subunidades α , α' e β se associam em várias combinações para formar proteínas triméricas com diferentes composições de subunidades que estão presentes na semente, especificamente nos corpos protéicos dos cotilédones e eixo embrionário (Sykes e Gayler, 1981; Ladin *et al.*, 1987; Sugimoto *et al.*, 1987). Sete “espécies moleculares” da β -conglícinina já foram isoladas e suas composições de subunidades foram identificadas como $\alpha'\beta\beta$, $\alpha\beta\beta$, $\alpha\alpha'\beta$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\alpha'$, $\alpha\alpha\alpha$ e $\beta\beta\beta$ (Morita *et al.*, 1996). A β -conglícinina, assim como a glicínina, se acumula durante o desenvolvimento da semente e é hidrolisada após a germinação para fornecer uma fonte de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento da planta (Higgins, 1984).

Os genes das subunidades da β -conglícinina fazem parte de uma família multigênica (Nielsen *et al.*, 1989; Nielsen, 1996; Krishnan, 2000; Krishnan *et al.*, 2006) que evoluiu a partir de eventos de duplicação e inserção/deleção (Harada *et al.*, 1989). Vários genes dessa família estão arranjados em *tandem* dentro de pequenas regiões do

DNA cromossomal, enquanto outros ocorrem de forma dispersa (Harada *et al.*, 1989). Os genes que codificam essas subunidades parecem ser transcritos de maneira coordenada, mas não idêntica, durante o desenvolvimento da semente (Yoshino *et al.*, 2001). Harada *et al.* (1989) identificaram uma família de 15 distintos genes da β -conglucininina (*CG-1* a *CG-15*) no genoma de soja.

As subunidades da β -conglucininina são codificadas por duas classes homólogas de mRNA, mRNA de 2,5 kb e mRNA de 1,7 kb, que diferem significativamente em tamanho (Goldberg *et al.*, 1981; Schuler *et al.*, 1982). Os genes que codificam as subunidades α e α' hibridizam preferencialmente com um mRNA de 2,5 kb (Yoshino *et al.*, 2001), o que os distingue dos demais genes que ou hibridizam com um mRNA de 1,7 kb ou hibridizam igualmente com essas duas classes de mRNA. As sequências dos mRNAs das subunidades α e α' são similares ou altamente relacionadas uma à outra (Yoshino *et al.*, 2001). Os mRNAs das subunidades da proteína β -conglucininina se acumulam durante períodos específicos de desenvolvimento da semente, sendo amplamente predominantes durante os estádios do meio da maturação até estádios tardios de desenvolvimento da semente (Chen *et al.*, 1988). O mRNA de 2,5 kb e, conseqüentemente, as subunidades α e α' acumulam-se mais cedo no desenvolvimento da semente do que o mRNA de 1,7 kb associado à expressão do gene da subunidade β (Gayler e Sykes, 1981; Meinke *et al.*, 1981; Ladin *et al.*, 1987).

Várias pesquisas têm relatado diferenças no molde espacial e temporal de acúmulo dessas três subunidades em embriões de soja em desenvolvimento (Ladin *et al.*, 1987; Meinke *et al.*, 1981; Harada *et al.*, 1989). Enquanto a subunidade α' está presente em níveis similares nos cotilédones e eixo embrionário, a subunidade β está presente nos cotilédones mas não se acumula no eixo embrionário, pois é rapidamente degradada após ser sintetizada em níveis extremamente baixos (Ladin *et al.*, 1987). A subunidade α , por sua vez, está presente em ambos, cotilédones e eixo embrionário, mas o nível é menor no último (Meinke *et al.*, 1981). Então, a subunidade α é sintetizada e/ou acumulada de uma maneira mais complexa do que as outras duas. A tradução *in vitro* do mRNA isolado a partir de cotilédones produziu um nível superior da subunidade α comparado com a tradução do mRNA isolado a partir do eixo embrionário (Ladin *et al.*, 1987). Esse experimento indiretamente indicou que o nível de mRNA do gene da

subunidade α é superior nos cotilédones, o que pode explicar para o maior acúmulo dessa subunidade nesse órgão. Portanto, a expressão dos genes que codificam para as subunidades α , α' e β da β -conglícinina está sob rigoroso controle tecido/órgão-específico e temporal durante a embriogênese da soja (Meinke *et al.*, 1981; Walling *et al.*, 1986). Pode-se dizer, então, que os genes da β -conglícinina são regulados transcricionalmente e que eventos pós-transcricionais como processamento de transcritos primários, exportação nuclear seletiva e estabilidade do mRNA podem ter papéis significativos no acúmulo diferencial dos mRNAs de 2,5 kb e 1,7 kb durante a embriogênese (Harada *et al.*, 1989).

Harada *et al.* (1989) demonstraram que os genes *CG-1* e *CG-4* codificantes das subunidades α' e β , respectivamente, diferem principalmente pela presença de um “elemento de inserção” de 0,56 kb no primeiro éxon do gene *CG-1*. Esse elemento está presente nos mRNAs de 2,5 kb codificantes das subunidades α'/α e é responsável pelas diferenças de tamanho entre os mRNAs de 2,5 kb e 1,7 kb. Essas comparações indicam que os genes da β -conglícinina são altamente homólogos e diferem pela presença ou ausência de um “elemento de inserção”. Dessa forma, as duas classes de mRNAs das subunidades da β -conglícinina não são originadas a partir do processamento diferencial de um transcrito precursor comum (Breitbart *et al.*, 1987), mas são o resultado da transcrição a partir de genes distintos. Uma vez que o gene *CG-1* mostrou especificidade para a subunidade α' (Doyle *et al.*, 1986), Yoshino *et al.* (2001) demonstraram que o gene *CG-3* é funcionalmente ativo e codifica a subunidade α .

Análises das atividades dos promotores dos genes das subunidades α , α' e β indicaram que o promotor do gene da subunidade α' possui maior atividade semente-específica que os demais e ele contém todos os *cis*-elementos requeridos para essa expressão (Beachy *et al.*, 1985). Em estudos realizados por Yoshino *et al.* (2006) não foi detectada nenhuma atividade do gene *GUS* em folhas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com cassetes de expressão contendo esse gene repórter sob controle do promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina, ficando a expressão restrita às sementes das plantas transgênicas. Isso confirma que esse promotor é semente-específico. A atividade de *GUS* foi detectada no embrião, mas não nas partes restantes

da semente depois que o embrião foi removido. Especificando um pouco mais, o promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina é embrião-específico.

Elementos regulatórios envolvidos na expressão espacial e temporal parecem coincidir entre os promotores dos genes que codificam para subunidades α , α' e β da β -conglícinina (Meinke *et al.*, 1981; Bray e Beachy, 1985; Holowach *et al.*, 1986; Naito *et al.*, 1988). Um *cis*-elemento que pode estar envolvido na ativação transcricional embrião-específica do gene da subunidade α da β -conglícinina é a sequência RY, que está envolvida na regulação de vários genes que codificam para proteínas de reserva em sementes. Sequências RY apresentando a sequência consenso CATGCA(C/T) estão amplamente distribuídas em promotores de genes semente-específicos (Dickinson *et al.*, 1988). A sequência RY tem sido definida como um *box* de leguminosa [CATGCATG] (Bäumlein *et al.*, 1992) ou uma sequência de 6 pares de bases [CATGCA] (Ezcurra *et al.*, 1999). Seis sequências RY foram encontradas na região *upstream* do gene que codifica para a subunidade α da β -conglícinina. Uma diminuição na expressão do gene repórter *GUS* foi detectada a partir de deleções na região 5' *upstream* contendo essas sequências RY. Os resultados dos experimentos feitos por Yoshino *et al.* (2001, 2006) indicaram uma associação entre a presença das sequências RY e a ativação transcricional embrião-específica do gene da subunidade α da β -conglícinina. Resultados de estudos anteriores sugeriram que outras sequências conservadas (*boxes* I, II, III e IV) também têm papéis decisivos na regulação da transcrição. Qinggele *et al.* (2007) verificaram que, em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, o gene repórter *GUS* foi expresso de uma maneira semente-específica quando estava sob controle de um fragmento de 666 pb correspondente ao promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina, o qual continha vários *cis*-elementos essenciais para o controle da expressão espacial e temporal desse gene (Qinggele *et al.*, 2007).

Para entender o mecanismo regulatório que controla a expressão do gene da subunidade α da β -conglícinina durante o desenvolvimento da semente, Imoto *et al.* (2008) transformaram plantas de *A. thaliana* com cassetes de expressão contendo o promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina e o gene repórter *GUS*. Esses autores verificaram que a ativação transcricional embrião-específica desse promotor está altamente associada com a presença das sequências RY, como tinha sido previamente

citado por outros pesquisadores (Yoshino *et al.*, 2001; Yoshino *et al.*, 2006). Eles relataram que a distribuição desigual da subunidade α da β -conglucina dentro dos embriões de soja é estabelecida como uma consequência da ativação transcricional diferencial do gene que codifica esse polipeptídeo, controlada por uma pequena região promotora em diferentes tecidos embrionários.

2.5- Silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) em plantas

Existem três vias de silenciamento de RNA em plantas e todas envolvem a clivagem de um dsRNA (RNA fita dupla) em pequenos RNAs de aproximadamente 21-25 nucleotídeos por uma enzima denominada Dicer (Tang e Galili, 2004; Kusaba, 2004; Filipowicz *et al.*, 2005). Esses RNAs são conhecidos como “pequenos RNAs de interferência” (siRNAs) e “microRNAs” (miRNAs) (Baulcombe, 2004).

A primeira via de silenciamento de RNA é o silenciamento por siRNA, que ocorre no citoplasma e mostra muitas similaridades ao mecanismo de RNAi (RNA de interferência) em animais. Durante essa via, o dsRNA formado nas células por uma síntese dependente de DNA ou RNA, que são introduzidos por infecção viral ou expressão artificial, é processado em siRNAs, resultando na degradação final de mRNAs com sequências totalmente complementares ao siRNA (Filipowicz *et al.*, 2005; Meister e Tuschl, 2004; Mello e Conte, 2004; Baulcombe, 2006).

A segunda via consiste do silenciamento de mRNAs endógenos por miRNAs. Esses miRNAs regulam negativamente a expressão do gene por pareamento aos mRNAs específicos, resultando em clivagem do mRNA ou bloqueio da tradução. Assim como os siRNAs, os miRNAs são pequenos RNAs de aproximadamente 21-24 nucleotídeos resultantes da clivagem de um precursor pela enzima Dicer (Tang e Galili, 2004; Filipowicz *et al.*, 2005; Baulcombe, 2004). Os miRNAs são derivados a partir de um precursor de RNA formado por sequências de repetições invertidas com regiões parcialmente de fita dupla (RNA *hairpin*), e eles têm como alvo mRNAs fita-simples complementares (Ambros, 2004). Essas duas primeiras vias de silenciamento são conhecidas como “silenciamento gênico pós-transcricional” (PTGS).

A terceira via de silenciamento de RNA em plantas está associada com a metilação do DNA e formação de heterocromatina, levando à supressão da transcrição.

Ela é denominada “silenciamento gênico transcricional” (TGS) e pode envolver a participação de siRNAs.

No processo de silenciamento por siRNA, quando um dsRNA transgênico ou viral (dsRNA exógeno) é gerado ele é clivado dentro da célula em pequenos dsRNAs de aproximadamente 21-25 nucleotídeos, denominados siRNAs, pela enzima Dicer, homóloga à RNase III de *E. coli* e que apresenta domínios de ligação a dsRNAs. Esses siRNAs são correspondentes às fitas *sense* e *antisense* do mRNA alvo e se associam à proteínas celulares de um complexo ribonucleoprotéico de 360 kDa denominado “Complexo de Silenciamento Induzido por RNA” (RISC). Os siRNAs devem ser fosforilados no seu terminal 5', um passo que requer ATP. O fosfato 5' gerado por uma enzima cinase específica pode ser um fator capaz de distinguir os siRNAs de outras espécies de pequenos RNAs. Uma vez que o complexo RISC de 360 kDa não é competente para clivar o mRNA alvo é proposto um passo de “desenrolamento” do siRNA realizado por uma RNA helicase depende de ATP, que separa as fitas *sense* e *antisense* do siRNA, o que está de acordo com evidências de que a fita *antisense* é responsável por guiar o complexo RISC até o mRNA alvo (Yang *et al.*, 2000; Pickford e Cogoni, 2003). A identificação de um complexo RISC “ativo” <232 kDa formado por siRNAs fita-simples pode ser o resultado da ação de uma RNA helicase no complexo RISC “inativo” de 360 kDa. Não se sabe, entretanto, se somente uma ou ambas as fitas de siRNA permanecem retidas nesse complexo ativo <232 kDa (Nykänen *et al.*, 2001). A enzima RNA helicase dependente de ATP pode ser parte do complexo RISC como um cofator dissociável (Pickford e Cogoni, 2003). A fita *antisense* do siRNA guia o complexo até o mRNA alvo e uma endorribonuclease integrante desse complexo, denominada Argonata, cliva esse mRNA, o qual é posteriormente degradado por exorribonucleases resultando em uma perda da expressão do gene alvo (Waterhouse e Helliwell, 2002; Kusaba, 2004; Tang e Galili, 2004; Mahmood-ur-Rahman *et al.*, 2008). A clivagem do mRNA pela proteína Argonata não requer ATP (Meister e Tushl, 2004; Tomari *et al.*, 2004; Nykänen *et al.*, 2001). As moléculas-guia de siRNAs permanecem associadas ao complexo RISC, permitindo a realização de múltiplas “rodadas” de clivagem de mRNAs alvos. O *turnover* da enzima é dependente de ATP, sugerindo que

a liberação do mRNA clivado possa envolver uma RNA helicase (Sontheimer, 2005; Haley e Zamore, 2004).

Alguns dos siRNAs podem ser usados como *primers* por uma enzima “RNA polimerase dependente de RNA” (RDR ou RdRP), resultando na formação de outra longa fita de dsRNA que pode continuar através da via do PTGS. Nessa reação, novos dsRNAs são formados a partir da amplificação do mRNA alvo realizada pela enzima RDR e podem ser imediatamente clivados em novos siRNAs pela enzima Dicer. Esse processo tem sido denominado “PCR degradativo” (Lipard *et al.*, 2001) e corresponde a um importante passo de amplificação do sinal de silenciamento desencadeado pelas enzimas RDRs. Esse processo pode também explicar a extrema eficiência da via de siRNA que pode ser iniciada por apenas poucas moléculas de dsRNA (Fire *et al.*, 1998; Shuey *et al.*, 2002; Mahmood-ur-Rahman *et al.*, 2008).

Em particular, o PTGS tem sido usado para diminuir a atividade de enzimas dessaturases que controlam a síntese dos principais ácidos graxos presentes nos óleos obtidos a partir de sementes (Liu *et al.*, 2002). Entre essas enzimas destacam-se a estearoil-CoA dessaturase plastidial e a ω -6 dessaturase. Em algodão, por exemplo, a composição de ácidos graxos foi geneticamente modificada por meio do silenciamento dos genes que codificam para essas enzimas, com a produção de óleos com baixo teor de ácido palmítico e alto conteúdo de ácidos oléico e esteárico (Liu *et al.*, 2002). Além disso, Liu *et al.* (2002) demonstraram que o PTGS do gene *GhFAD2-1* pôde anular quase completamente a atividade da ω -6 dessaturase em sementes de algodão, aparentemente sem prejudicar o desenvolvimento e germinação da semente ou o crescimento da nova planta. Isto evidencia o poder desta tecnologia como ferramenta molecular para gerar variedades com características agronomicamente importantes.

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como meta correlacionar o padrão de expressão do gene que codifica a subunidade α da β -conglícinina (gene *BC*) com o padrão de expressão do gene que codifica a enzima ω -6 dessaturase microssomal de soja (gene *GmFAD2-1A*) e, através dessa correlação, analisar se o promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina (promotor pBC) apresenta potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética de soja que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A*.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a subunidade α da β -conglícinina em oito estádios de desenvolvimento da semente em cinco diferentes variedades de soja.
- Analisar, através da técnica de PCR em Tempo Real (qRT-PCR), o padrão de expressão dos genes *GmFAD2-1A* e *BC* ao longo dos oito estádios de enchimento do grão nas cinco variedades de soja e correlacionar seus padrões de expressão.
- Comparar a concentração da subunidade α da β -conglícinina com o padrão de expressão do gene *BC* nos oito estádios de enchimento do grão de soja nas cinco variedades.
- Verificar se ocorrem alterações na concentração da subunidade α da β -conglícinina e no padrão de expressão do gene *BC* em variedades de soja que diferem quanto ao teor protéico (“normal” e “alto”) e ciclos de vida (precoce e tardio).

- Analisar se os genes endógenos *GAPDH* e *EF1b* normalizam os dados de expressão dos genes alvos *BC* e *GmFAD2-1A* de modo semelhante e qual gene de referência é o melhor controle endógeno para as variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente considerados no presente trabalho.

- Analisar se o promotor do gene da subunidade α da β -conglucininina apresenta potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética de soja que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material genético

Foram utilizadas cinco variedades de soja: MONARCA, PTN-182, CAC-1, CD 201 e CD 2013PTA106B3. A variedade PTN-182 corresponde à isolinha da variedade MONARCA, sendo que a primeira apresenta maior teor protéico. CD 2013PTA106B3 é isolinha de CD 201, com a primeira apresentando maior teor protéico. MONARCA é uma variedade de soja derivada de CAC-1, existindo, portanto, muitas características genotípicas e fenotípicas semelhantes entre elas. MONARCA, PTN-182 e CAC-1 são cultivares de ciclo tardio, enquanto CD 201 e CD 2013PTA106B3 são variedades de ciclo precoce. Ou seja, CD 201 e sua isolinha florescem e produzem sementes mais cedo, mais precocemente, do que as variedades de ciclo tardio. Para as cinco variedades citadas acima, o ciclo tardio compreende de 135-140 dias para a planta secar completamente (sementes totalmente maduras – último estágio de enchimento do grão) e o ciclo precoce compreende de 110-115 dias para tal ocorrência.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, no período de novembro de 2008 a fevereiro de 2009, sob aquecimento controlado e fotoperíodo de 14 horas de luz. A temperatura foi monitorada tendo valores médios de temperatura máxima de 34,9°C e mínima de 21,9°C. As sementes foram plantadas em vasos de três litros de solo previamente adubado, cultivando-se três plantas por vaso. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cerca de 20 vasos por variedade.

As sementes de cada variedade foram coletadas separadamente, divididas em oito estádios de desenvolvimento, que compreenderam todo o período de enchimento do grão, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Esses estádios foram determinados com base no peso de matéria fresca da semente (Lanna, 2002):

1° estágio: 0 a 75 mg

2° estágio: 76 a 150 mg

3° estágio: 151 a 225 mg

4° estágio: 226 a 300 mg

5° estágio: 301 a 375 mg

6° estágio: 376 a 450 mg

7° estágio: 451 a 525 mg

8° estágio: sementes maduras

4.2- Determinação da porcentagem de proteína total pelo método de Kjeldahl

A porcentagem de proteína total nas sementes maduras (último estágio) de cada variedade foi determinada com base no método de Kjeldahl, descrito nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para cada variedade, as amostras foram analisadas em triplicata. Na fase de digestão, para que a amostra fosse oxidada, adicionou-se ao tubo digestor 10 mL de uma mistura digestora (1 L de ácido sulfúrico, 10 g de sulfato de cobre e 10 g de selênio). Os tubos foram colocados no bloco digestor e aquecidos gradativamente até uma temperatura de 340°C, permanecendo nesta temperatura por 1 h, quando então foram retirados e esfriados à temperatura ambiente por 15 min. A cada tubo foi adicionado peróxido de hidrogênio 30% (v/v) sendo novamente levados ao aquecimento por 1 h, após o qual foram novamente esfriados e adicionados a cada um 10 mL de água destilada. No processo de oxidação, o nitrogênio presente na amostra é convertido em sais de amônio, que permanecem no digerido. Para cada análise realizada foi necessário o preparo de um branco, que foi constituído da mistura digestora e do papel empregado na pesagem das amostras.

Na fase de destilação, o tubo digestor contendo o material digerido foi conectado ao aparelho de destilação, o qual apresentava na outra extremidade uma ponta mergulhada em um frasco *erlenmeyer* contendo solução de ácido bórico 4% e indicador misto de Tashiro. No tubo contendo a amostra digerida foram adicionados ~25 mL de hidróxido de sódio 40% (p/v). Os sais de amônio presentes no tubo foram alcalinizados pela adição do hidróxido de sódio resultando na formação de amônia. Por arraste de vapor durante a destilação, a amônia foi recolhida no *erlenmeyer* contendo a solução de ácido bórico formando o metaborato de amônio, responsável pela mudança de cor do indicador. Na fase de titulação, o metaborato de amônio foi titulado por solução diluída de ácido clorídrico, até nova mudança de cor do indicador de pH. A quantidade de ácido que foi gasto na titulação correspondia à concentração de amônia, que por sua vez

representava a concentração de nitrogênio nas amostras. A partir da concentração de nitrogênio, foi calculada a porcentagem de proteína total nas amostras usando-se a equação abaixo:

$$\%PT = \left(\frac{(V_A - V_B) \times M \times f \times 1,4}{P} \right) \times FCN$$

Onde:

%PT = porcentagem de proteína total;

V_A = volume (mL) de solução de HCl gastos na titulação da amostra;

V_B = volume (mL) de solução de HCl gastos na titulação do branco;

M = molaridade da solução de HCl;

f = fator de correção da concentração da solução de HCl;

P = massa (g) da amostra;

FCN = fator de conversão de nitrogênio para proteína (6,25)

4.3- Extração de proteínas de sementes de soja e quantificação da subunidade α da β -conglucina por SDS-PAGE/densitometria

A extração de proteínas foi feita a partir de sementes de soja nos oito estádios de enchimento do grão das cinco variedades. As sementes de soja foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e, em seguida, 100 mg da semente macerada (100 mg de farelo de soja) foram colocados em tubos *Eppendorf* de 1,5 mL e adicionados 1,0 mL de tampão de extração (tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,6; NaCl 0,4 M; β -mercaptoetanol 0,28%). Os tubos foram colocados por 45 min em banho ultrasom *Branson* 1210, sendo posteriormente centrifugados por 15 min a 12.000 g.

A subunidade α da β -conglucina foi separada das demais subunidades e polipeptídeos das proteínas de reserva da semente de soja por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida, contendo SDS e β -mercaptoetanol, conforme descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel separador foi de 12,5% e do gel empilhador foi de 5,0%. As condições da corrida foram: 40 V até que o corante atingisse a superfície do gel de separação (~3 h), aumentando-se a voltagem para 110 V até o final da corrida,

que foi determinado como sendo de ~8 h após o corante ter entrado no gel de separação. As separações eletroforéticas foram realizadas na presença de marcadores de massa molecular (*Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis – GE Healthcare*) e de um padrão de concentração (BSA). Terminada a corrida, os géis foram colocados em solução corante [*Comassie Brilliant Blue G* 0,15% (p/v); ácido acético 9% (v/v) e etanol 45% (v/v)] por 36 h e depois em solução descorante [ácido acético 7,5% (v/v) e etanol 25% (v/v)] por 12 h.

As amostras foram analisadas em triplicata para cada estágio de cada variedade, sendo que em cada gel foram aplicados 3,0 µL do padrão de concentração BSA (1,0 µg/µL), 16,0 µL do extrato protéico correspondente ao 1º estágio de desenvolvimento da semente de soja e 4,0 µL do extrato protéico proveniente dos demais estágios (2º ao 8º).

A subunidade α da β -conglícinina foi identificada com base na sua mobilidade eletroforética, baseando-se nos resultados publicados por Yaklich (2001). A determinação da concentração da subunidade α da β -conglícinina nos oito estágios de desenvolvimento da semente das cinco variedades de soja foi feita por densitometria através do uso do *software* de análise de imagens de gel de eletroforese 1D, *LabImage 1D*, da *Loccus biotecnologia*, com base no padrão de concentração (BSA) aplicado nos géis.

4.4- Análise do padrão de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

4.4.1- Extração de RNA total de sementes de soja

A extração de RNA total das sementes de soja nos oito estágios de desenvolvimento das cinco variedades foi conduzida de acordo com a metodologia proposta por Sambrook *et al.* (1989), com algumas adaptações ao protocolo original. Todas as etapas de extração de RNA total foram realizadas a 4°C e em condições livres de RNase.

Foram macerados cerca de 4 g de sementes de soja na presença de nitrogênio líquido e a cada amostra foram adicionados 18 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5; EDTA 1 mM e SDS 1%), 6 mL de fenol e 6mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados vigorosamente em

agitador vórtex por 15 min e centrifugados a 4°C por 10 min a 8.000 g. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e nele foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 2M e 2 volumes de etanol 95% e, em seguida, a mistura foi incubada por 1 h a -20°C. Foi realizada uma nova centrifugação a 8.000 g por 15 min e o precipitado resultante foi lavado com etanol 70% e ressuscitado em 2,5 mL de água DEPC (água deionizada tratada com dietil pirocarbonato). Após uma centrifugação de 5 min a 5.000 g, o sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foram adicionados 2,5 mL de cloreto de lítio 4 M. O tubo foi incubado por cerca de 6 h a -20°C para promover a precipitação do RNA. A amostra foi então centrifugada a 8.000 g por 30 min e o precipitado foi ressuscitado em 1,8 mL de água DEPC e acrescido de 0,2 mL de acetato de sódio 2 M e 3,6 mL de etanol 95%. Após precipitação por cerca de 12 h a 4°C, a solução foi centrifugada a 8.000 g por 10 min e, em seguida, o precipitado foi lavado em etanol 70% e, depois de seco, ressuscitado em 200 µL de água DEPC.

As amostras de RNA total foram quantificadas a 260 nm e a sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas do RNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

4.4.2- Tratamento do RNA total com DNase e síntese de cDNA

O RNA total foi tratado com *RQ1 RNase-free DNase* (Promega), com o objetivo de eliminar a contaminação das amostras com DNA. Amostras de 40 µg de RNA total foram tratadas com 8 U de DNase e incubadas em tampão DNase 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0; MgSO₄ 10 mM e CaCl₂ 1 mM) por 55 min a 37°C e extraídas com igual volume (50 µL) de fenol e de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram agitadas em agitador vórtex por 1 min e centrifugadas a 12.000 g por 2 min, a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo tubo e foi realizada uma nova extração com 100 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A fase superior foi então submetida à precipitação com 250 µL de etanol 95% e 30 µL de acetato de sódio 3 M, por 1 h a -20°C. A seguir, foi feita uma nova centrifugação a 12.000 g por 5 min a 4°C, o precipitado resultante foi lavado com 500 µL de etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 20 µL de água DEPC. As amostras foram novamente

quantificadas em espectrofotômetro e avaliadas quanto à integridade, como descrito anteriormente.

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de RNA total tratados com DNase (2 µg) dos oito estádios de desenvolvimento da semente de cada variedade foram incubadas com 1 µL de oligo (dT)₁₂₋₁₈ e 1 µL dos quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10 mM cada, a 65°C por 5 min e, em seguida, incubadas no gelo. A seguir foi adicionado tampão de PCR 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3; KCl 375 mM e MgCl₂ 15 mM), DTT 0,1 M, 40 U de *RNaseOUT*TM *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* e as amostras foram incubadas a 37°C por 2 min. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* e as amostras foram incubadas a 37°C por 50 min e a reação foi inativada por aquecimento a 70°C por 15 min. Para cada amostra foi feito um controle negativo contendo todos os reagentes, com exceção da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase*.

A verificação de possível contaminação com DNA genômico foi realizada pela amplificação do cDNA com *primers* de actina de soja (*Forward*: 5' CCC CTC AAC CCA AAG GTC AAC AG 3' e *Reverse*: 5' GGA ATC TCT CTG CCC CAA TTG TG 3'). Cada reação de amplificação de 20 µL foi constituída de 1 µL de cDNA; Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; 0,25 mM de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,25 µM do par de *primers* para actina e 1 U de Taq DNA polimerase (*Phoneutria*). Quando na presença de DNA genômico de soja, a reação de amplificação com os *primers* de actina produz um fragmento de 520 pb, já na presença de cDNA observa-se apenas um fragmento de 439 pb devido à remoção de um íntron de 81 pb (Shah *et al.*, 1982).

Os ciclos de amplificação da reação de PCR foram constituídos por uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min, seguida de 30 ciclos constituídos por: uma segunda etapa de desnaturação a 94°C por 30 s, uma etapa de anelamento dos *primers* ao cDNA alvo a 56°C por 30 s e uma etapa de extensão a 72°C por 20 s. Após o 30º ciclo foi realizado um passo final de extensão a 72°C por 4 min.

O produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado.

4.4.3- Desenho dos *primers* para PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise do padrão de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir das sequências de nucleotídeos dos cDNAs correspondentes aos genes de soja que codificam a subunidade α da β -conglitinina (gene *BC*), a enzima ω -6 dessaturase microssomal (gene *GmFAD2-1A*), a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gene *GAPDH*) e o fator de elongação 1B da tradução (gene *EF1b*). Todas essas sequências estão depositadas no banco de dados público *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*). O programa utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos foi o programa *Primer Express 3.0* (*Applied Biosystems*). As sequências dos *primers* selecionados e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 1.

Em seguida foram feitas reações de RT-PCR para amplificar os fragmentos correspondentes aos genes listados acima, com o objetivo de confirmar a especificidade dos oligonucleotídeos desenhados. Cada reação de amplificação continha 1 µL de cDNA; Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; 0,2 mM de cada um dos quatro dNTPs; 0,2 µM de cada par de *primers* e 1 U de Taq DNA polimerase (*Phonetrria*), totalizando um volume final de 25 µL. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 min seguida por 40 ciclos (94°C por 30 seg; 60°C por 30 seg e 72°C por 20 seg) e uma última etapa de extensão a 72°C por 2 min. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídeo. O padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado

Tabela 1 – Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR em soja

Gene	Número de acesso (<i>GenBank</i>)	Oligonucleotídeo	Tamanho dos fragmentos
<i>BC</i>	AB197785	(F) 5' GATGAGGAACAAGATGAACGTCAAT 3'	70 pb
		(R) 5' CTTGCTTTCGCTCTTCCTTC 3'	
<i>GmFAD2-1A</i>	L43920	(F) 5' ACTCATGTGGCTCACCATCTC 3'	77 pb
		(R) 5' ATTGGCTTGATTGCATTGGTT 3'	
<i>GAPDH</i>	DQ192668	(F) 5' GGGTGGTGCAAAGAAGGTTATTA 3'	72 pb
		(R) 5' TCGTTGACACCAACAACAACA 3'	
<i>EF1b</i>	EV279336*	(F) 5' TACGATGCTGTCTCTTCTCAACTT 3'	75 pb
		(R) 5' AGCAGCGCCACTGAATCTTAC 3'	

O símbolo (*) corresponde ao número de acesso da sequência de cDNA do gene *EF1b* de soja que foi obtido a partir do artigo de Hu *et al.* (2009) e, segundo esses autores, esse gene apresenta como loco ortólogo em *Arabidopsis thaliana* a sequência de número de acesso AT5G12110 (*GenBank* - *NCBI*), correspondente à subunidade 1α do fator de alongação 1B. (F) *Primer Forward*, (R) *Primer Reverse*.

4.4.4- PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Foram utilizados dois controles endógenos para normalização dos dados de qRT-PCR em todas as placas de reações: os genes *GAPDH* e *EF1b*. E dois genes foram alvos para a quantificação: *BC* e *GmFAD2-1A*. As amostras foram analisadas em três repetições biológicas, sendo que cada amostra foi aplicada em triplicata em cada placa de reação.

Inicialmente foram feitos ensaios para a determinação da concentração ótima de cada par de *primer*. As concentrações de oligonucleotídeos testadas foram de 0,1; 0,2; 0,4 e 0,6 μM para os pares de *primers* correspondentes aos genes *GmFAD2-1A* e *GAPDH*; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 μM para o par de *primer* do gene *EF1b*; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 μM para o par de *primer* do gene *BC*. Em seguida foi realizado o teste de eficiência da reação com as concentrações ótimas de *primers* obtidas, usando diluições seriadas do cDNA sintetizado (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Os componentes de cada reação de qRT-PCR foram 1,0 μL de cDNA diluído 10X; 10,0 μL de *SYBR® Green PCR Master Mix 2X* (tampão, *SYBR® Green*, *AmpliTaQ Gold®* DNA Polymerase, dNTPs e ROX) (Applied Biosystems) e cada par de *primer* em sua concentração ótima (*BC*: 0,8 μM ; *GmFAD2-1A*: 0,2 μM ; *GAPDH*: 0,4 μM e *EF1b*: 0,6 μM) em um volume final de reação de 20,0 μL . As condições de amplificação foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos constituídos por: uma etapa de desnaturação a 95°C por 15 seg e uma etapa de anelamento e extensão dos *primers* a 60°C por 1 min. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação, com o objetivo de verificar se havia ocorrido amplificação inespecífica ou formação de dímeros de *primers*.

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$ (Livak, 2001).

4.5- Análises estatísticas

Cada experimento foi analisado individualmente. Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para avaliação dos resultados da

porcentagem de proteína total pelo método de Kjeldahl foi feito teste de média (Tukey) no delineamento inteiramente casualizado (DIC). Na análise dos resultados referentes à quantificação da subunidade α da β -conglucina por densitometria e referentes ao qRT-PCR foi feito fatorial 5X8, no DIC, procedendo-se aos testes de médias (Tukey). Toda a análise estatística foi realizada usando o *software* SAEG (Sistema para Análises Estatísticas) (Funarbe, 1993).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Avaliação da porcentagem de proteína total nas sementes maduras das cinco variedades de soja

Verifica-se na Tabela 2 o resumo da análise de variância da variável “porcentagem de proteína total” em função do fator “variedades de soja”, que apresentou efeito significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Tabela 2: Resumo da análise de variância da porcentagem de proteína total em função de diferentes variedades de soja.

FV ^{1/}	GL	Quadrados Médios
VAR	4	60,21610*
Resíduo	8	3,119117
CV %		4,551

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{1/} **VAR** (Variedade): MONARCA, PTN-182, CAC-1, CD 201, CD 2013PTA106B3.

Os resultados obtidos através do teste de Tukey (Tabela 3 e Figura A1 do Anexo) indicaram que as variedades MONARCA (39,23%) e CD 201 (34,58%) apresentaram menor teor protéico que suas respectivas isolinhas, PTN-182 (47,64%) e CD 2013PTA106B3 (39,88%), como era esperado. MONARCA (39,23%) e CAC-1 (35,78%) não diferiram estatisticamente no teor de proteína da semente madura, o que era esperado pelo fato da primeira ser uma variedade de soja derivada da segunda. MONARCA resultou de um evento de segregação de CAC-1 e apresenta pequenas diferenças em relação a essa última variedade, como maior altura da planta, maior número de nós/planta e número superior de vagens/nó. A maior porcentagem de proteína total foi observada no cultivar PTN-182 em relação a todos os demais.

Tabela 3: Valores médios da porcentagem de proteína total em função de diferentes variedades de soja.

VAR (Variedade)	Médias
MONARCA	39,23 BC
PTN-182	47,64 A
CAC-1	35,78 BC
CD 201	34,58 C
CD 2013PTA106B3	39,88 B

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2- Determinação da concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina em vários estádios do desenvolvimento da semente de soja

A Figura 1 mostra o padrão eletroforético obtido por SDS-PAGE dos extratos protéicos correspondentes aos oito estádios de desenvolvimento da semente da variedade CD 201.

Somente pela comparação visual da intensidade das bandas no gel da Figura 1 pode-se observar que houve um aumento na concentração da subunidade α da β -conglícinina ao longo do desenvolvimento da semente de soja. Resultados semelhantes foram obtidos para as outras variedades (dados não mostrados). Para uma confirmação mais exata, foi feita a quantificação por densitometria usando o *software LabImage 1D* (*Loccus biotecnologia*), com base no padrão de concentração (BSA) aplicado nos géis, procedendo-se às análises estatísticas.

A fim de padronizar as interpretações realizadas nesse e nos tópicos posteriores, foi feita a seguinte associação: 1° e 2° estádios (início da maturação), 3° ao 6° (meio da maturação), 7° e 8° (final da maturação).

Na Tabela 4 encontra-se o resumo da análise de variância da variável “concentração da subunidade α da β -conglícinina (μg da subunidade α/mg de farelo de soja)” em função dos fatores “variedades de soja” e “estádios de desenvolvimento da semente”.

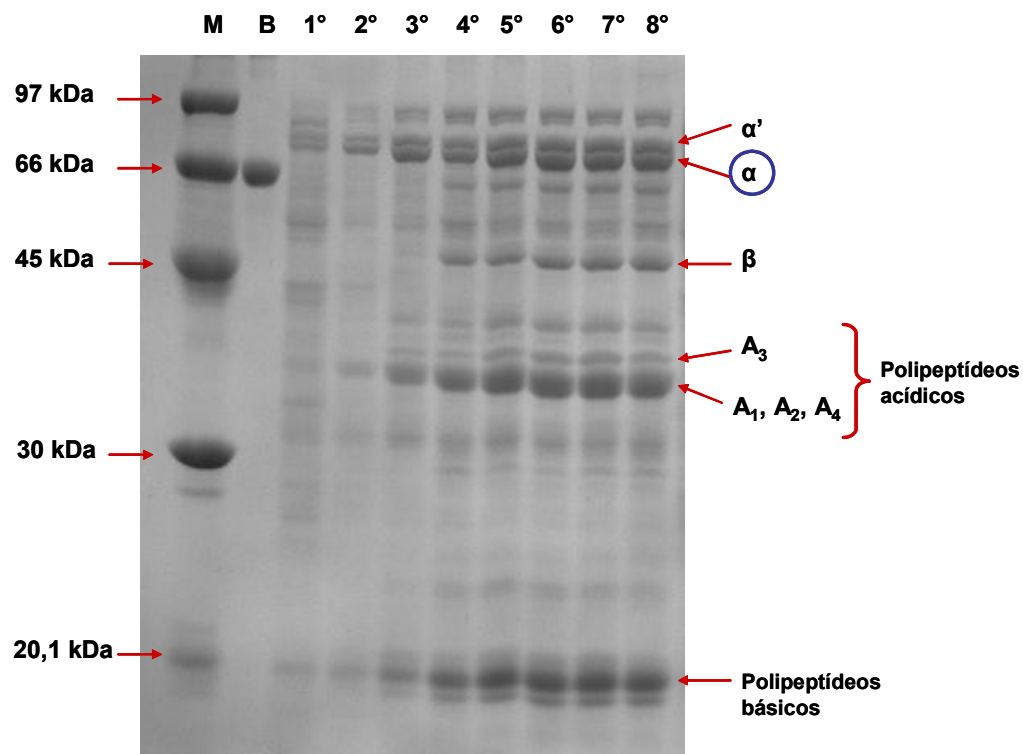


Figura 1: Gel SDS-PAGE dos extratos protéicos correspondentes aos oito estádios de desenvolvimento da semente da variedade CD 201. As setas vermelhas apontam para os polipeptídeos que compõem as principais proteínas de reserva da semente de soja: α' (~76 kDa), α (~72 kDa) e β (~52-54 kDa) são as subunidades da proteína β -conglucina. Os polipeptídeos ácidos A_3 (~43 kDa), A_1 , A_2 , e A_4 (~40 kDa) e básicos (~20 kDa) fazem parte das subunidades da proteína glicina. A identificação dos polipeptídeos foi feita com base em trabalhos publicados na literatura (Yaklich, 2001). Os números referem-se aos estádios de desenvolvimento da semente de soja (1° ao 8°). (B) corresponde ao padrão de concentração BSA e (M) refere-se ao marcador de massa molecular (97; 66; 45; 30 e 20,1 kDa).

Tabela 4: Resumo da análise de variância da concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina (μg da subunidade α/mg de farelo de soja) em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

FV ^{1/}	GL	Quadrados Médios
VAR	4	7,172651*
EST	7	45,27943*
VAR x EST	28	0,522220*
Resíduo	80	0,071202
CV %		6,355

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{1/} **VAR** (Variedade): MONARCA, PTN-182, CAC-1, CD 201, CD 2013PTA106B3; **EST** (Estádio de desenvolvimento da semente de soja): 1° (0 a 75 mg), 2° (76 a 150 mg), 3° (151 a 225 mg), 4° (226 a 300 mg), 5° (301 a 375 mg), 6° (376 a 450 mg), 7° (451 a 525 mg) e 8° (sementes maduras).

Verifica-se que houve interação significativa entre os dois fatores analisados a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Desdobrando-se a interação e procedendo-se ao teste de médias (Tukey), o estudo do fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente” (Tabela 5 e Figura A2 do Anexo) mostrou que do 1° ao 3° estágio não houve diferença significativa na concentração da subunidade α da β -conglícinina entre as variedades dentro de cada um desses estádios, exceto para CAC-1 que apresentou valores menores no 2° e 3° estádios comparado às outras quatro variedades. Tomando-se como referência os cultivares MONARCA e CD 201, CAC-1 foi a variedade que apresentou os menores valores de concentração do correspondente polipeptídeo nos estádios 4, 7 e 8, o mesmo ocorrendo com CD 2013PTA106B3 no 4° estágio. CAC-1 também mostrou valores inferiores de concentração da subunidade α no 6° estágio em relação às demais variedades. No 5° estágio, o maior valor para a variável em estudo foi obtido com a variedade CD 201.

Tabela 5: Valores médios da concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina (μg da subunidade α/mg de farelo de soja) em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

EST (Estádio de desenvolvimento da semente)	VAR (Variedade)				
	MONARCA	PTN-182	CAC-1	CD 201	CD 2013PTA106B3
1°	0,4729 A e	0,7556 A e	0,4127 A e	0,6981 A d	0,6204 A f
2°	3,2950 A d	3,0775 A d	1,9417 B d	3,1025 A c	3,2692 A e
3°	4,8292 A c	4,4358 A c	2,7667 B c	4,3050 A b	4,4575 A d
4°	4,9533 A c	4,3033 B c	3,6050 C b	4,4150 AB b	3,6783 C e
5°	5,2742 B bc	4,6275 C c	4,4375 C a	6,1192 A a	4,8592 BC cd
6°	5,6775 BC ab	5,3567 C ab	4,7225 D a	6,1567 AB a	6,4758 A a
7°	6,3325 AB a	5,8442 BC a	4,9758 D a	6,5183 A a	5,6408 C b
8°	5,6400 AB b	4,9600 C bc	3,4808 D b	6,1633 A a	5,2917 BC bc

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em seguida, estudando-se o fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja” (Tabela 5 e Figura A3 do Anexo), verificou-se que as variedades MONARCA e PTN-182 apresentaram as maiores concentrações da subunidade α da β -conglícinina nos estádios 6 e 7 quando comparado com o 1º estágio, que foi aquele em que houve menor concentração do polipeptídeo em estudo. Para os demais cultivares, também determinou-se que a menor concentração da subunidade α estava no 1º estágio e, em relação à ele, os maiores valores foram encontrados nos estádios do meio para o final da maturação da semente: 5º ao 7º (CAC-1), 5º ao 8º (CD 201) e 6º (CD 2013PTA106B3).

Observando-se a Tabela 5 e as Figuras A2 e A3 (Anexo), pode-se concluir que, de forma geral, a variedade CAC-1 foi a que apresentou menores concentrações da subunidade α da β -conglícinina em vários estádios de enchimento do grão quando comparado com os demais cultivares. Além disso, a concentração da subunidade α foi inferior nos estádios iniciais de desenvolvimento da semente (1º e 2º) quando comparada aos estádios do meio para o final da maturação, indicando que ocorreu um acúmulo desse polipeptídeo ao longo da maturação para todas as variedades analisadas, apresentando uma concentração alta e significativa na semente madura.

Grande parte dos estudos relativos ao acúmulo da proteína β -conglícinina e de suas subunidades ao longo do desenvolvimento da semente de soja foram publicados na década de 80, com as publicações mais recentes sendo focadas no estudo dos genes que codificam essas subunidades e de suas respectivas regiões regulatórias. É importante destacar que cada autor classifica os estádios de desenvolvimento da semente de acordo com critérios próprios. Por isso, os estádios de aparecimento e acúmulo da subunidade α e de seu respectivo mRNA podem alterar de uma publicação para outra. Gayler e Sykes (1981) demonstraram, por densitometria, que ocorreram diferenças nos tempos de aparecimento e períodos de máximo acúmulo das três principais subunidades da β -conglícinina no cultivar de soja Wayne. As subunidades α e α' apareceram mais cedo no desenvolvimento da semente, entre 15 e 17 dias após o florescimento (15-17 DAF), enquanto a subunidade β somente apareceu cerca de 5 dias depois (22 DAF). Apesar do aparecimento posterior da subunidade β , a sua síntese continuou por pelo menos 10 dias após as outras duas subunidades terem alcançado seus níveis máximos de acúmulo,

sendo que na semente madura todas apresentaram níveis similares de concentração. De forma geral, Gayler e Sykes (1981) demonstraram que as subunidades da β -conglícinina apareceram durante estádios do início e meio do desenvolvimento da semente de soja de uma maneira regulada temporalmente ocorrendo um acúmulo dessas três subunidades ao longo da maturação da semente de soja.

Apesar da utilização de uma forma diferente de classificação dos estádios de maturação da semente, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os relatados por Gayler e Sykes (1981).

Ladin *et al.* (1987) realizaram um estudo mais detalhado do acúmulo diferencial das subunidades α , α' e β entre cotilédones e eixo embrionário. Considerando o cultivar de soja Provar, enquanto o polipeptídeo α' esteve presente em quantidades consideradas iguais nos cotilédones e eixo embrionário, a subunidade α , assim como seu mRNA, estiveram presentes em níveis menores no eixo embrionário, indicando que os genes que codificam essas subunidades, apesar de altamente relacionados, foram diferencialmente expressos nos dois tecidos examinados. De acordo com esses autores, a subunidade β foi sintetizada no eixo embrionário em níveis extremamente baixos, mas foi rapidamente degradada, não se acumulando nesse tecido. Eles encontraram uma redução de ~40 vezes no nível do mRNA que codifica essa subunidade no eixo embrionário quando comparado aos cotilédones. Estudos anteriores haviam detectado a presença da subunidade β apenas nos cotilédones (Meinke *et al.*, 1981). Todos esses resultados indicaram uma regulação temporal e tecido-específica do acúmulo das subunidades da proteína β -conglícinina ao longo da maturação da semente de soja.

Ao comparar as variedades que diferem quanto à porcentagem de proteína total (Tabela 3 e Figura A1 do Anexo) em relação à concentração da subunidade α da β -conglícinina ao longo dos 8 estádios de desenvolvimento da semente (Tabela 5 e Figura A2 do Anexo), verificou-se que as variedades MONARCA e CD 201 apresentaram concentrações superiores da subunidade α quando comparadas com suas respectivas isolinhas de maiores teores protéicos, PTN-182 e CD 2013PTA106B3, em vários estádios de desenvolvimento da semente (MONARCA: 4°, 5° e 8° / CD 201: 4°, 5°, 7° e 8°). Essa diferença ocorreu principalmente nos estádios do meio para o final da maturação, com nenhuma diferença significativa sendo detectada do 1° ao 3° estágio. A

variedade CAC-1 que apresentou teor protéico inferior apenas ao do cultivar PTN-182, foi a que mostrou menores concentrações do polipeptídeo em estudo, como discutido anteriormente.

Yaklich (2001), em um estudo envolvendo 14 variedades de soja com alto teor protéico e 5 com teor protéico considerado “normal”, demonstrou por densitometria, que de forma geral, cultivares de soja que possuíam maior teor protéico apresentavam maiores concentrações das proteínas β -conglícinina e glicínina quando comparados aos cultivares com teor protéico “normal”, sendo que as quantidades das subunidades α , α' e β e dos polipeptídeos acídicos e básicos que compõem essas proteínas de reserva diferiram entre as variedades analisadas. Entretanto, em alguns cultivares de maior teor protéico não houve diferença significativa nas concentrações dessas subunidades e/ou polipeptídeos em relação aos cultivares de teor protéico “normal”.

Krishnan *et al.* (2007) confirmaram as observações gerais feitas por Yaklich (2001), em um estudo envolvendo 3 variedades de alto teor protéico (PI 427138, BARC-6 e LG00-13260) e um cultivar de teor protéico “normal” (Williams 82). Esses autores verificaram que em todos os cultivares com maior porcentagem de proteína houve um aumento quantitativo na concentração da maioria das subunidades e polipeptídeos das proteínas β -conglícinina e glicínina quando comparado ao cultivar Williams 82 e sugeriram que a ocorrência desse fato estaria associada à uma expressão preferencial dos genes que codificam para essas subunidades e polipeptídeos durante o desenvolvimento da semente de soja. A concentração da subunidade α foi 20-40% superior nos cultivares com maior porcentagem de proteína total, enquanto para as demais subunidades da β -conglícinina esse aumento foi de 5-59% (α') e variou de -3 a +85% para a subunidade β .

Ao comparar os resultados encontrados na literatura (Yaklich, 2001; Krishnan *et al.*, 2007) com os obtidos no presente trabalho relativos à correlação entre a porcentagem de proteína total na semente madura e a concentração da subunidade α da β -conglícinina verificaram-se grandes diferenças. Somente ao comparar as variedades CAC-1 (teor protéico “normal”) e PTN-182 (alto teor protéico) os resultados estiveram em concordância com os obtidos por outros pesquisadores. Em relação aos outros cultivares, os resultados foram contrários aos publicados na literatura, uma vez que as

variedades MONARCA e CD 201, consideradas de teor protéico “normal”, apresentaram concentrações superiores da subunidade α quando comparadas com suas respectivas isolinhas de maiores teores protéicos (PTN-182 e CD 2013PTA106B3) em vários estádios de maturação da semente.

A explicação mais provável é que nas isolinhas de maior porcentagem de proteína total outras subunidades da β -conglícinina (α' e β) e os polipetídeos ácidos e básicos que compõem a glicínina, assim como outras proteínas presentes na semente de soja que não são proteínas de reserva, estariam presentes em concentrações mais elevadas do que nas variedades de teor protéico “normal”, sendo responsáveis por essa maior porcentagem de proteína total nas variedades PTN-182 e CD 2013PTA106B3. Segundo Morita *et al.* (1996), a proteína β -conglícinina não se apresenta somente na combinação $\alpha\alpha'\beta$, o que é confirmado pela existência de “espécies moleculares” formadas por diferentes combinações sendo que algumas delas não incluem a presença da subunidade α ($\alpha'\beta\beta$ e $\beta\beta\beta$). Ou seja, apesar das variedades de alto teor protéico terem apresentado concentrações menores da subunidade α em vários estádios de maturação da semente, elas poderiam apresentar elevadas concentrações da proteína β -conglícinina nas formas triméricas $\alpha'\beta\beta$ e $\beta\beta\beta$, além de quantidades superiores da proteína de reserva glicínina e de outras proteínas que não são de reserva, contribuindo para essa maior porcentagem de proteína total na semente madura.

Ao comparar o grupo de variedades de ciclo tardio com o de ciclo precoce em relação à concentração da subunidade α da β -conglícinina (Tabela 5 e Figura A2 do Anexo) não foi encontrado um padrão de concentração desse polipeptídeo que permitisse diferenciar um grupo do outro quanto à concentração da subunidade α ao longo do desenvolvimento da semente. O único destaque nessa correlação foi a variedade CAC-1 (ciclo tardio), que como dito anteriormente, apresentou os menores valores de concentração da subunidade α ao longo de vários estádios da maturação da semente.

5.3- Análise do padrão de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* durante o desenvolvimento da semente de soja através da técnica de PCR em Tempo Real

Nos experimentos de PCR em Tempo Real (qRT-PCR), cada amostra foi analisada em três repetições biológicas e em triplicata em cada placa de reação. Os resultados da eficiência das reações de qRT-PCR para os pares de *primers* específicos dos genes alvos e endógenos são apresentados nas Figuras A4 e A5 (Anexo). As curvas de dissociação (*Curva de Melt*) e valores de T_m para os *amplicons* resultantes da amplificação dos quatro genes são mostrados nas Figuras A6 e A7 (Anexo), que são relativos ao 2º estágio da variedade MONARCA. A especificidade de cada *amplicon* foi confirmada pela presença de um pico único, indicando a ausência de amplificações inespecíficas e de formação de dímeros de *primers*. O mesmo resultado foi obtido para as demais variedades. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método comparativo $2^{-\Delta Ct}$ (Livak, 2001).

Os dados de qRT-PCR devem ser normalizados para permitir sua correta interpretação, o que pode ser alcançado através do uso de genes de referência (genes endógenos) cuja expressão seja constitutiva. Entre os genes de referência comumente usados estão um grande número de genes *housekeeping*, como os que codificam a actina (*ACT*), tubulina (*TUB*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), poliubiquitina (*UBQ*) e fator de alongação 1- α (*EF1 α*). Considera-se que esses genes sejam constitutivamente expressos, uma vez que eles estão envolvidos em processos celulares básicos e ubíquos. Entretanto, existem evidências de que os níveis de transcritos de genes *housekeeping* podem variar consideravelmente em resposta à mudanças nas condições experimentais e/ou tipos de tecidos, de tal forma que nenhum desses genes pode ser visto como uma referência universal. Em muitos casos, um único gene de referência é inadequado, podendo levar a conclusões erradas sobre o padrão de expressão dos genes alvos (Hu *et al.*, 2009). Por isso, no presente trabalho, para validar os resultados da expressão dos dois genes alvos (*BC* e *GmFAD2-1A*) utilizaram-se dois controles endógenos (*GAPDH* e *EF1b*) para a normalização dos dados.

5.3.1- Análise do padrão de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* utilizando o gene *GAPDH* como controle endógeno

A avaliação do padrão de expressão do gene que codifica a subunidade α da β -conglícinina (gene *BC*), utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*, foi feita por PCR em Tempo Real (qRT-PCR) e, posteriormente, foi realizada a análise estatística dos dados para determinar diferenças significativas no padrão de expressão do gene alvo entre as 5 variedades de soja e os 8 estádios de desenvolvimento da semente.

Verifica-se na Tabela 6 o resumo da análise de variância da variável “expressão do gene *BC*” em função dos fatores “variedades de soja” e “estádios de desenvolvimento da semente”.

Tabela 6: Resumo da análise de variância da expressão do gene *BC*, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH* e usando o método $2^{-\Delta C_t}$ para cálculo da expressão gênica, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

FV ^{1/}	GL	Quadrados Médios
VAR	4	424,0992*
EST	7	1.449,910*
VAR x EST	28	82,57129*
Resíduo	80	36,46006
CV %		45,539

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{1/} **VAR** (Variedade): MONARCA, PTN-182, CAC-1, CD 201, CD 2013PTA106B3; **EST** (Estádio de desenvolvimento da semente de soja): 1° (0 a 75 mg), 2° (76 a 150 mg), 3° (151 a 225 mg), 4° (226 a 300 mg), 5° (301 a 375 mg), 6° (376 a 450 mg), 7° (451 a 525 mg) e 8° (sementes maduras).

Verifica-se que houve interação significativa entre os dois fatores analisados a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Desdobrando-se a interação e procedendo-se ao teste de médias (Tukey), o estudo do fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente” (Tabela 7 e Figura A8 do Anexo) mostrou

que o padrão de expressão do gene *BC* não diferiu entre as variedades dentro dos estádios 1, 6 e 8. Nos estádios 2 e 3, MONARCA apresentou valores superiores de expressão gênica em relação à CAC-1, comportamento também observado nos cultivares CD 2013PTA106B3 (2º estágio) e CD 201 (3º estágio). O padrão de expressão do gene *BC* foi exatamente o mesmo dentro dos estádios 4 e 5: MONARCA se destacou com valores mais elevados quando comparada com as duas variedades de ciclo precoce (CD 201 e sua isolinha). No 7º estágio, MONARCA e PTN-182 (ciclo tardio) mostraram a mais alta expressão em relação à CD 201.

Posteriormente, foi realizado o estudo do fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja” (Tabela 7 e Figura A9 do Anexo). Em estádios do início e meio da maturação, as variedades MONARCA (2º, 3º e 4º) e CAC-1 (2º e 3º) apresentaram valores superiores de expressão do gene *BC* quando comparado com a semente madura (8º estágio). A isolinha PTN-182 também mostrou um comportamento semelhante, com maior expressão gênica nos estádios 2 e 3 em relação a estádios do meio e final da maturação (6º e 8º). Analisando os resultados referentes à CD 201 e sua isolinha ficou evidente que, nos dois cultivares, o padrão de expressão do gene alvo foi superior nos estádios 2 e 3 em relação aos estádios do meio para o final da maturação (4º ao 8º).

Observando-se a Tabela 7 e as Figuras A8 e A9 (Anexo), verificou-se que o padrão de expressão do gene *BC* foi semelhante entre as 5 variedades dentro de vários estádios de desenvolvimento da semente. Como exemplo, nota-se que em 3 dos 8 estádios (1º, 6º e 8º) não houve diferença significativa no padrão de expressão gênica entre as variedades dentro de cada um desses estádios. Destaque pode ser dado ao cultivar MONARCA que, de acordo com as interpretações estatísticas, esteve sempre presente entre as variedades de maior expressão do gene *BC* dentro de todos os 8 estádios.

Tabela 7: Valores médios de $2^{-\Delta C_t}$ da expressão do gene *BC*, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

EST (Estádio de desenvolvimento da semente)	VAR (Variedade)				
	MONARCA	PTN-182	CAC-1	CD 201	CD 2013PTA106B3
1°	10,1865 A cd	10,9234 A bc	3,4831 A ab	13,0834 A bc	13,4488 A bc
2°	31,4402 A ab	25,8602 AB ab	15,5451 B a	25,8543 AB ab	30,9635 A a
3°	38,8005 A a	28,4644 AB a	17,8318 B a	35,7064 A a	28,7199 AB ab
4°	25,2038 A abc	12,7781 AB bc	11,9028 AB ab	5,9327 B c	5,6629 B c
5°	22,3598 A bc	11,6560 AB bc	10,3764 AB ab	3,0728 B c	4,2318 B c
6°	13,4667 A cd	9,8693 A c	11,5380 A ab	0,6848 A c	1,8452 A c
7°	19,4377 A bc	15,1536 A abc	7,2551 AB ab	0,4677 B c	7,1161 AB c
8°	0,0114 A d	0,0269 A c	0,0024 A b	0,0100 A c	0,0049 A c

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, a expressão do gene *BC* aumentou ao longo dos estádios iniciais da maturação, até atingir os estádios 2 e 3, onde ocorreu um pico de expressão gênica em todas as variedades quando comparado ao 8° estágio. Em relação ao 3° estágio, verificou-se nas variedades analisadas, exceto para CAC-1, que em quase todos os estádios posteriores do desenvolvimento da semente houve uma diminuição na expressão do gene *BC*, embora ela ainda permanecesse relativamente alta nos cultivares MONARCA e PTN-182, sendo que nas variedades CD 201 e CD 2013PTA106B3 essa redução no nível de expressão foi elevada. Para CAC-1 a expressão gênica permaneceu praticamente constante e alta ao longo de grande parte da maturação. A expressão na semente madura (8° estágio) pode ser considerada quase nula quando comparada com a dos estádios 2 e 3 para todas as 5 variedades, o que pode ser explicado pelo fato de no último estágio de desenvolvimento a semente estar em estado de dormência, apresentando um metabolismo extremamente baixo, de tal forma que a expressão da maioria dos genes é mínima. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Harada *et al.* (1989).

Harada *et al.* (1989) verificaram que os mRNAs associados à expressão dos genes das três subunidades da β -conglícinina se acumulam e decaem durante períodos específicos do desenvolvimento da semente. A transcrição desses genes é ativada cedo durante o desenvolvimento, apresentando uma taxa de transcrição relativamente alta em estádios do meio da maturação, sendo que ocorre repressão da transcrição anterior à dormência da semente. Dessa forma, não há detecção de expressão desses genes na semente madura. Essas observações indicam que o aumento e diminuição nos níveis dos mRNAs que codificam para as subunidades α , α' e β durante o desenvolvimento da semente são devido, em parte, a eventos transcricionais e que esse tipo de regulação é similar àquele verificado em genes que codificam para proteínas de semente. Esses autores também verificaram que o mRNA de 2,5 kb (subunidades α/α') e o mRNA de 1,7 kb (subunidade β) se acumulam diferencialmente durante o desenvolvimento da semente, com o primeiro se acumulando mais cedo do que o segundo, o que é consistente com o acúmulo anterior das subunidades α e α' quando comparado à subunidade β durante a maturação.

A atividade do promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina ao longo do desenvolvimento da semente de soja está principalmente relacionada à ligação de proteínas específicas nos *cis*-elementos dessa região regulatória. Grande parte das publicações mais recentes concentrou-se na identificação desses *cis*-elementos responsáveis por determinar a expressão embrião-específica (semente-específica) do gene da subunidade α .

Yoshino *et al.* (2001) identificaram a presença de *cis*-elementos na região regulatória do gene que codifica a subunidade α da β -conglícinina (CG-3) que eram necessários para determinar a expressão semente-específica desse gene. As sequências 5'-CATGCATG-3' (sequência RY) e 5'-CAACACATG-3' são conservadas em promotores de genes que codificam para proteínas de reserva em sementes. O TATA *box* e as regiões denominadas *boxes* I, II, III e IV são conservadas entre os promotores dos genes das subunidades α e α' da β -conglícinina e de genes da β -faseolina em feijão. Esses *boxes* atuam conjuntamente na transcrição coordenada dos genes que codificam as subunidades da β -conglícinina e também na transcrição tecido/órgão-específica e temporal desses genes durante o desenvolvimento da semente.

Posteriormente, Yoshino *et al.* (2006) demonstraram a importância da sequência RY no controle da transcrição semente-específica do gene da subunidade α da β -conglícinina. Para isso, a região promotora desse gene, com uma série de deleções a partir da sua extremidade 5', foi fusionada ao gene repórter *GUS* e os cassetes de expressão resultantes foram introduzidos em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Em plantas transformadas contendo o fragmento do promotor até a posição -1357, relativa ao sítio de início da transcrição, a atividade do *GUS* foi detectada nas sementes em níveis crescentes ao longo de alguns estádios da maturação, não sendo detectada em folhas. Além disso, a atividade do *GUS* foi detectada em todo o embrião, confirmando que esse promotor dirige uma expressão embrião-específica (semente-específica). A atividade do gene repórter foi observada somente quando fragmentos do promotor iguais ou maiores do que 245 pares de bases, em relação ao sítio de início da transcrição, foram usados na construção dos cassetes de expressão. De forma geral, essa atividade diminuiu com a diminuição no tamanho da região promotora, o que foi associado com deleções de sequências RY. Esses resultados são consistentes com a idéia de que múltiplos *cis*-

elementos, incluindo as sequências RY, estão envolvidos na ativação transcricional embrião-específica do gene da subunidade α da β -conglícinina em soja.

Qinggele *et al.* (2007) isolaram e comprovaram a funcionalidade de um fragmento de 666 pb referente ao promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina. A análise *in silico* dessa sequência identificou a presença de vários *cis*-elementos característicos de um promotor semente-específico. Além dos elementos regulatórios citados por Yoshino *et al.* (2001), foram encontrados novos *cis*-elementos: motivo rico em A/T, motivos AGCCCA, TACACAT, ACGT e E-box.

Em um estudo recente, Imoto *et al.* (2008) comprovaram que a distribuição desigual da subunidade α da β -conglícinina dentro dos embriões de soja (Ladin *et al.*, 1987) é estabelecida, principalmente, como uma consequência da ativação transcricional diferencial do gene controlada por uma pequena região promotora em diferentes tecidos embrionários. A metodologia foi semelhante à utilizada por Yoshino *et al.* (2006), com o gene *GUS* estando sob controle do promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina. Em plantas transformadas contendo a região promotora até a posição -1357 não foi detectada expressão gênica em embriões em 4 DAF (4 dias após o florescimento). A atividade do *GUS* foi observada nos cotilédones em 7 DAF, o que somente ocorreu no eixo embrionário em 8 DAF. Em estádios posteriores de desenvolvimento do embrião houve um aumento na expressão do gene em ambos os tecidos. Em 14 DAF, a atividade do *GUS* foi detectada no embrião inteiro, entretanto ela ainda foi três vezes superior nos cotilédones do que no eixo embrionário.

De forma geral, os maiores níveis de expressão do gene *GUS* ocorreram em estádios tardios da embriogênese. Esses resultados sugeriram que o acúmulo da subunidade α em um nível superior nos cotilédones do que no eixo embrionário poderia ser atribuído, principalmente, à uma diferença na ativação transcricional do gene entre esses dois tecidos, embora o controle pós-transcricional também esteja envolvido na expressão de genes que codificam para proteínas de reserva em sementes (Walling *et al.*, 1986).

Ao analisar a expressão do gene *GUS* ao longo da embriogênese (6 a 14 DAF) nas plantas que foram transformadas com os demais fragmentos do promotor resultantes das deleções a partir da extremidade 5', os resultados obtidos foram idênticos àqueles

observados com o fragmento -1357. Entretanto, nenhuma atividade do gene repórter foi detectada nos embriões contendo fragmentos do promotor menores do que 245 pb. Essas observações indicaram que a região promotora até a posição -245 foi suficiente e essencial para determinar uma expressão embrião-específica e os *cis*-elementos responsáveis pela ativação transcricional do gene nos cotilédones e eixo embrionário estão localizados na região -245 a -161.

Segundo Yoshino *et al.* (2006) e Imoto *et al.* (2008), o tamanho da região promotora influencia na taxa de transcrição, sem afetar o molde de transcrição espacial e temporal desse gene. Ou seja, fragmentos menores do promotor determinam uma menor taxa de transcrição do gene, mas a expressão continua sendo embrião-específica e em maior nível nos cotilédones do que no eixo embrionário.

De acordo com os resultados obtidos por Yoshino *et al.* (2006) e Imoto *et al.* (2008), pode-se sugerir que a expressão do gene *BC* esteja principalmente relacionada com a atividade do seu respectivo promotor. Dessa forma, nos estádios e variedades em que houver maior expressão do gene *BC* pode-se sugerir que o promotor do gene da subunidade α da β -conglitinina (promotor pBC) apresenta maior atividade, estimulando uma maior taxa de transcrição desse gene, provavelmente devido à ligação de proteínas específicas em seus *cis*-elementos. Quanto menor o padrão de expressão do gene *BC* pode-se sugerir que menor é a atividade do promotor, e nos estádios e variedades em que a expressão do gene alvo for quase nula pode-se sugerir que o promotor pBC está com uma capacidade mínima para ativar a transcrição do gene *BC*.

Após essas considerações deve-se estender todos os resultados e análises feitas no estudo do padrão de expressão do gene *BC* para avaliar a atividade do promotor pBC. Dessa forma, pode-se sugerir que para as variedades de soja em estudo, tomando-se como padrão de referência a semente madura, houve um aumento na atividade do promotor pBC à medida que iniciou a maturação da semente, com esse promotor apresentando uma atividade máxima para ativar a transcrição do gene *BC* em estádios do início para o meio da maturação (2° e 3° estádios). Em direção aos estádios finais do desenvolvimento da semente e tendo como referência o 3° estádio, pode-se sugerir que a atividade do promotor pBC diminuiu, exceto para a variedade CAC-1, e que na semente

madura ele apresentou uma capacidade mínima para ativar a transcrição do gene *BC* em todos os 5 cultivares.

Fazendo-se um paralelo entre a concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina (Tabela 5 e Figura A3 do Anexo) e o padrão de expressão do gene *BC* ao longo dos 8 estádios de desenvolvimento da semente nas 5 variedades de soja (Tabela 7 e Figura A9 do Anexo), verificou-se que no 1º estágio de desenvolvimento houve uma baixa expressão do gene e uma baixa concentração do polipeptídeo correspondente. Porém, ao longo da maturação da semente grandes diferenças foram observadas entre a expressão do gene *BC* e a concentração da subunidade α para todas as 5 variedades. Enquanto uma concentração ainda relativamente baixa do polipeptídeo foi encontrada no 2º estágio, um dos maiores valores de expressão gênica esteve associado a esse estágio. A partir do 3º estágio em direção ao final da maturação verificou-se, de forma geral, um aumento na concentração da subunidade α para todas as variedades analisadas. Em relação ao gene *BC*, após apresentar um pico de expressão nos estádios 2 e 3 em relação à semente madura, sua expressão diminuiu relativamente em vários estádios do meio para o final da maturação, exceto para CAC-1, sendo que essa diminuição foi mais evidente nas variedades CD 201 e sua isolinha. A principal diferença foi encontrada no 8º estágio (semente madura) de todas as variedades, que apresentou uma concentração relativamente alta e significativa do polipeptídeo, apesar de uma expressão quase nula do gene *BC* em relação aos estádios 2 e 3 de maior expressão gênica.

Meinke *et al.* (1981) demonstraram que os mRNAs das subunidades da proteína β -conglícinina eram detectados em estádios de desenvolvimento da semente (14-16 dias após a antese/sementes com massa de 10-25 mg) anterior ao acúmulo da proteína no cotilédono (18-20 dias após a antese/65-85 mg). As subunidades α e α' , por exemplo, foram detectadas 17 a 19 dias após a antese (45-65 mg). Shuttuck-Eidens e Beachy (1985), por sua vez, mostraram que as subunidades eram facilmente detectadas *in vitro* cerca de 16-18 dias após a antese (25-45 mg), indicando que a tradução dos mRNAs ocorria antes do acúmulo da proteína ser detectada. Esses mRNAs foram também encontrados associados aos polirribossomos nesse estágio, indicando a ocorrência de tradução. Além disso, esses autores demonstraram que o *turnover* das subunidades da β -conglícinina por proteólise é mais rápido em estádios iniciais de desenvolvimento do

cotilédone do que em estádios tardios. Dessa forma, essa degradação poderia dificultar a detecção das subunidades α , α' e β em estádios muito iniciais da maturação, consistente com o atraso observado entre o aparecimento dos mRNAs e o acúmulo da proteína. Esses dados indicaram que as subunidades da β -conglícinina não são intrinsicamente estáveis e que sua estabilidade aumenta durante a maturação da semente. No presente trabalho, a detecção de mRNA relativo ao gene *BC* e da subunidade α da β -conglícinina no 1º estágio de desenvolvimento da semente poderia ser explicado pelo fato das sementes de soja classificadas dentro desse estágio apresentarem massa de até 75 mg, o que, de acordo com os resultados obtidos por Meinke *et al.* (1981), seria um estágio em que ambos, mRNA e polipeptídeo, seriam detectados.

Ao comparar as variedades que diferem quanto à porcentagem de proteína total (Tabela 3 e Figura A1 do Anexo) em relação ao padrão de expressão do gene *BC* entre as 5 variedades ao longo do desenvolvimento da semente (Tabela 7 e Figura A8 do Anexo), verificou-se que a expressão gênica não diferiu estatisticamente entre as variedades MONARCA e PTN-182, o mesmo ocorrendo entre CD 201 e CD 2013PTA106B3, apesar de MONARCA e CD 201 terem apresentando maiores concentrações da subunidade α em vários estádios do meio para o final da maturação quando comparadas às suas respectivas isolinhas de maiores teores protéicos. Ou seja, não houve diferença na expressão do gene *BC* quando comparou-se uma variedade de soja e sua respectiva isolinha de maior teor protéico ao longo do desenvolvimento da semente.

Como dito anteriormente, Shuttuck-Eidens e Beachy (1985) verificaram que as subunidades da β -conglícinina não são intrinsicamente estáveis e que sua estabilidade aumenta durante a maturação da semente. Pode-se então sugerir que, apesar do padrão de expressão do gene *BC* não ter diferido entre MONARCA e PTN-182, a maior concentração da subunidade α em vários estádios na variedade MONARCA poderia ser devido à uma maior estabilidade do polipeptídeo nesse cultivar, enquanto ele ainda poderia ser relativamente instável e sofrer proteólise nesses estádios da PTN-182, dificultando sua detecção. O mesmo é válido para CD 201 e sua isolinha. Apesar de MONARCA e CAC-1 não diferirem no teor de proteína da semente madura, CAC-1 apresentou menor padrão de expressão gênica em dois estádios da maturação (2º e 3º),

sendo também a variedade que mostrou menores concentrações do polipeptídeo em estudo.

Ao comparar o grupo de variedades de ciclo tardio com o de ciclo precoce em relação ao padrão de expressão do gene *BC* entre as 5 variedades durante o desenvolvimento da semente (Tabela 7 e Figura A8 do Anexo), pode-se verificar que as diferenças se destacaram nos estádios do meio para o final da maturação. No 4º e 5º estádios, MONARCA (ciclo tardio) apresentou valores superiores de expressão gênica quando comparada com as duas variedades de ciclo precoce (CD 201 e sua isolinha), enquanto no 7º estágio duas variedades de ciclo tardio (MONARCA e PTN-182) apresentaram expressão do gene *BC* superior à de CD 201. De forma geral, não foi encontrado um padrão de expressão do gene *BC* que permitisse diferenciar um grupo do outro quanto ao perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento da semente, com algumas diferenças ocorrendo em poucos estádios da maturação.

Após a avaliação do perfil de expressão do gene *BC*, foi feita a análise do padrão de expressão do gene que codifica a enzima ω -6 dessaturase microsomal de soja (gene *GmFAD2-1A*), também usando *GAPDH* como controle endógeno. Na Tabela 8 encontra-se o resumo da análise de variância da variável “expressão do gene *GmFAD2-1A*” em função dos fatores “variedades de soja” e “estádios de desenvolvimento da semente”.

Tabela 8: Resumo da análise de variância da expressão do gene *GmFAD2-1A*, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH* e usando o método $2^{-\Delta Ct}$ para cálculo da expressão gênica, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

FV ^{1/}	GL	Quadrados Médios
VAR	4	0,876108 ^{ns}
EST	7	10,31420*
VAR x EST	28	1,896439*
Resíduo	80	0,501979
CV %		46,687

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{1/} **VAR** (Variedade): MONARCA, PTN-182, CAC-1, CD 201, CD 2013PTA106B3; **EST** (Estádio de desenvolvimento da semente de soja): 1° (0 a 75 mg), 2° (76 a 150 mg), 3° (151 a 225 mg), 4° (226 a 300 mg), 5° (301 a 375 mg), 6° (376 a 450 mg), 7° (451 a 525 mg) e 8° (sementes maduras).

Verifica-se, na tabela acima, que houve interação significativa entre os dois fatores analisados a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Desdobrando-se a interação e procedendo-se ao teste de médias (Tukey), o estudo do fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente” (Tabela 9 e Figura A10 do Anexo) mostrou que o perfil de expressão do gene *GmFAD2-1A* não diferiu entre as variedades dentro dos estádios 1, 4 e 8. Todos os cultivares apresentaram exatamente o mesmo padrão de expressão gênica nos estádios 2 e 3: CD 2013PTA106B3 apresentou valores superiores quando comparada com as três variedades de ciclo tardio (MONARCA, PTN-182 e CAC-1). Nos estádios do meio para o final da maturação da semente (5° ao 7°), destacou-se a variedade PTN-182, com valores mais elevados de expressão do gene *GmFAD2-1A* quando comparada com as duas variedades de ciclo precoce (5° estágio) e com CD 201, CD 2013PTA106B3 e CAC-1 (7° estágio). No 6° estágio, PTN-182 e CAC-1 apresentaram maior expressão do gene alvo em relação à CD 201.

Tabela 9: Valores médios de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão do gene *GmFAD2-1A*, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

EST (Estádio de desenvolvimento da semente)	VAR (Variedade)				
	MONARCA	PTN-182	CAC-1	CD 201	CD 2013PTA106B3
1°	0,7720 A ab	0,7174 A cd	0,6355 A ab	1,0716 A bc	1,3364 A b
2°	1,4046 B ab	1,3762 B bcd	1,2619 B ab	2,7799 AB ab	3,4947 A a
3°	1,9110 B a	2,2339 B abc	2,3049 B a	3,4442 AB a	4,0555 A a
4°	2,0923 A a	1,8438 A abc	2,0395 A a	1,6963 A abc	1,4695 A b
5°	2,2856 AB a	2,7492 A ab	1,8284 AB a	0,8482 B c	0,8462 B b
6°	1,4722 AB ab	1,8325 A abc	1,9568 A a	0,2037 B c	0,5517 AB b
7°	1,8411 AB a	3,4349 A a	1,2986 B ab	0,2386 B c	1,3320 B b
8°	0,0093 A b	0,0103 A d	0,0074 A b	0,0070 A c	0,0076 A b

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em seguida, foi realizado o estudo do fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja” (Tabela 9 e Figura A11 do Anexo). Em estádios do meio para o final da maturação, as três variedades de ciclo tardio, MONARCA (3°, 4°, 5° e 7°), PTN-182 (3° ao 7°) e CAC-1 (3° ao 6°) apresentaram valores maiores de expressão do gene *GmFAD2-1A* quando comparado com a semente madura (8° estágio). Avaliando os resultados referentes à CD 201, o padrão de expressão do gene alvo foi superior nos estádios 2 e 3 em relação a estádios do meio para o final da maturação (5° ao 8°). Para a sua isolinha (CD 2013PTA106B3), a maior expressão gênica foi encontrada nos estádios 2 e 3 quando comparado a todos os demais estádios.

De modo geral, observando-se a Tabela 9 e as Figuras A10 e A11 (Anexo), verifica-se que em quase metade dos estádios de desenvolvimento da semente (1°, 4° e 8°) não houve diferença significativa no padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* entre os 5 cultivares dentro de cada um desses estádios. Nas três variedades de ciclo tardio ocorreu uma elevada expressão do gene *GmFAD2-1A* ao longo de vários estádios de maturação da semente, com os maiores valores sendo encontrados nos estádios 3, 4, 5 e 7 (MONARCA), 3 a 7 (PTN-182) e 3 a 6 (CAC-1) comparado à semente madura (8° estágio), em que a expressão pode ser considerada quase nula em relação a esses estádios. Para as variedades de ciclo precoce, o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* foi inferior em vários estádios do meio para o final da maturação (CD 201: 5° ao 8°; CD 2013PTA106B3: 4° ao 8°) quando comparado aos estádios 2 e 3 de maior expressão gênica. Dessa forma, considerando o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* entre os estádios dentro de cada variedade, verificou-se que enquanto os maiores valores de expressão gênica foram encontrados em estádios do meio e final da maturação nas variedades de ciclo tardio, o oposto ocorreu com as de ciclo precoce. Diferenças no padrão de expressão gênica também foram observados por Hernández *et al.* (2009) ao analisarem a expressão do gene *OepFAD2-2* em 5 cultivares de oliveira. Esses autores sugeriram que os níveis de expressão de genes que codificam para ω -6 dessaturases são dependentes da variedade. Os resultados do padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A*, principalmente relativos às variedades de ciclo precoce, estão em concordância com os obtidos por Heppard *et al.* (1996).

Heppard *et al.* (1996), trabalhando com o cultivar de soja Rye, compararam o padrão de expressão dos genes *GmFAD2-1*, posteriormente denominado *GmFAD2-1A* (Tang *et al.*, 2005), e *GmFAD2-2* ao longo do desenvolvimento da semente. O nível de expressão do gene *GmFAD2-2* foi superior ao do gene *GmFAD2-1A* nos estádios iniciais de maturação da semente (6-10 DAF / sementes com massa de 5-10 mg), que é quando grandes quantidades de lipídios de membrana são sintetizados. Entretanto, os transcritos do gene *GmFAD2-1A* aumentaram rapidamente durante o desenvolvimento da semente, apresentando um pico em estádios do meio da maturação (19-21 DAF / 61-150 mg) e então diminuíram gradualmente nos estádios finais. Então, o “tempo de expressão” do gene *GmFAD2-1A* coincide com o da biossíntese de ácidos graxos e armazenamento de triacilgliceróis nas sementes em desenvolvimento.

Grande parte dos estudos relacionados aos genes *GmFAD* de soja foram direcionados para verificação da alteração na expressão gênica em plantas cultivadas em diferentes temperaturas (Heppard *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Schlueter *et al.*, 2007). Embora ocorra um aumento nos níveis de ácido linoléico em sementes em condições de baixa temperatura, verificou-se que não há aumento na expressão do gene *GmFAD2-1A*, ao contrário do que é observado em altas temperaturas de crescimento. Esse aumento na expressão poderia ser devido à instabilidade da enzima ω -6 dessaturase codificada por esse gene em temperaturas mais elevadas (Heppard *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2005). Um importante resultado foi obtido por Schlueter *et al.* (2007) que identificaram a ocorrência de amplificação de um dos transcritos resultantes de *splicing* alternativo do gene *GmFAD2-1A* (*GmFAD2-1A_L*) em tecidos vegetativos além de sementes, ao contrário de vários trabalhos anteriores que somente haviam detectado a expressão desse gene em sementes em desenvolvimento (Heppard *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 2005).

Hernández *et al.* (2005 e 2009), através de análises por qRT-PCR, avaliaram o padrão de expressão de três genes que codificam para ω -6 dessaturases em oliveira (*OepFAD2-1*, *OepFAD2-2* e *OepFAD6*) em diferentes tecidos (drupas jovens, mesocarpo, folhas e sementes em desenvolvimento). O gene *OepFAD2-1* foi expresso em todos os tecidos analisados, assim como os demais genes, diferindo apenas nos níveis de expressão. Em relação à semente em vários estádios de desenvolvimento, esse

gene foi altamente expresso em 16-19 semanas após o florescimento (estádios iniciais) e sua expressão diminuiu rapidamente em estádios posteriores e se manteve em um nível constante e baixo durante o amadurecimento do fruto.

Com o objetivo de analisar se o promotor do gene da subunidade α da β -conglitinina (promotor pBC) apresenta potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética de soja que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A*, foi feita uma correlação entre o padrão de expressão dos genes *BC* (Tabela 7 e Figura A9 do Anexo) e *GmFAD2-1A* (Tabela 9 e Figura A11 do Anexo) ao longo dos 8 estádios de desenvolvimento da semente nas 5 variedades de soja. Devido à grande diferença nos valores de $2^{-\Delta Ct}$ entre os genes *BC* e *GmFAD2-1A* ao longo da maturação da semente nas 5 variedades analisadas, com o gene *BC* apresentando valores muito superiores de $2^{-\Delta Ct}$ quando comparado ao gene *GmFAD2-1A*, essa correlação foi feita por uma comparação direta, sem a realização de análise estatística, entre os padrões de expressão desses dois genes ao longo do desenvolvimento da semente. Em virtude das variedades de ciclo tardio e precoce terem apresentado diferenças no perfil de expressão do gene *GmFAD2-1A* em estádios do meio e final da maturação, a correlação dos padrões de expressão dos dois genes alvos foi feita considerando-se o grupo das variedades de ciclo tardio e outro das variedades de ciclo precoce.

Tomando-se como padrão de referência a semente madura (8º estágio), foi visto que para os cultivares do primeiro grupo (MONARCA, PTN-182 e CAC-1), os maiores valores de expressão do gene *BC* ocorreram nos estádios 2 e 3, do início em direção ao meio da maturação. Como foi dito anteriormente, de acordo com estudos anteriores (Yoshino *et al.*, 2006 e Imoto *et al.*, 2008), pode-se sugerir que, nesses estádios, o promotor pBC apresentou maior atividade. Após o 3º estágio e tomando-o como referência, houve uma diminuição na expressão do gene *BC* ao longo do desenvolvimento da semente, exceto para CAC-1 em que não houve diferença no perfil de expressão ao longo desse período. Pode-se sugerir que essa diminuição na expressão do gene *BC* esteja associada à uma diminuição na atividade do promotor pBC. Considerando o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A*, para as três variedades os maiores valores foram encontrados em estádios do meio para o final da maturação, comparado ao 8º estágio. Dessa forma, para os cultivares MONARCA, PTN-182 e

CAC-1, nos estádios em que foi verificada maior taxa de transcrição do gene *GmFAD2-1A* pode-se sugerir que o promotor pBC está ativo ou com uma capacidade máxima para ativar a transcrição do gene alvo. Na semente madura, comparado aos estádios de maior expressão gênica, pode-se sugerir que o promotor pBC apresentou uma atividade extremamente baixa, porém também não houve expressão significativa do gene *GmFAD2-1A*. Apesar da expressão do gene *GmFAD2-1A* ter sido superior à do gene *BC* na semente madura da variedade CAC-1, pode-se ainda sugerir que o promotor pBC apresenta potencial para ser usado em eventos de transformação genética de soja, uma vez que a etapa de amplificação do sinal de silenciamento desencadeada pelas enzimas “RNA polimerase dependente de RNA” (RDRs) garante a extrema eficiência da via de siRNA mesmo sendo iniciada por apenas poucas moléculas de dsRNA (Fire *et al.*, 1998; Shuey *et al.*, 2002; Mahmood-ur-Rahman *et al.*, 2008). Devido às diferenças nos valores médios de $2^{-\Delta Ct}$ dos genes *BC* e *GmFAD2-1A*, sendo esses valores de 20,1/1,5 (MONARCA) e 14,3/1,8 (PTN-182), respectivamente, com o gene *BC* apresentando um valor médio de $2^{-\Delta Ct}$ de no mínimo oito vezes maior do que o gene *GmFAD2-1A*, pode-se sugerir que mesmo ocorrendo uma diminuição na expressão do gene *BC* e na atividade do promotor pBC a partir do 3º estágio nas variedades MONARCA e PTN-182, essa expressão foi ainda superior à do gene *GmFAD2-1A*, o que teoricamente garante um nível alto de expressão do transgene sob controle desse promotor até mesmo nos estádios de maturação da semente em que estão ocorrendo as mais altas expressões do gene endógeno *GmFAD2-1A*, garantindo o silenciamento gênico pós-transcricional desejado.

Analisando as variedades do segundo grupo (CD 201 e CD 2013PTA106B3), enquanto o padrão de expressão do gene *BC* foi superior nos estádios 2 e 3 em relação aos estádios do meio para o final da maturação (4º ao 8º), um perfil de expressão semelhante ocorreu com o gene *GmFAD2-1A*. Para CD 201 e sua isolinha, os maiores valores de expressão desse gene também ocorreram nos estádios 2 e 3 em relação a estádios posteriores de desenvolvimento da semente (CD 201) ou até mesmo em relação a todos os demais estádios (CD 2013PTA106B3). Logo, pode-se sugerir que a maior atividade do promotor pBC ocorreu nos mesmos estádios em que foram encontrados os maiores valores de expressão do gene *GmFAD2-1A* (2º e 3º estádios). Nos estádios

posteriores da maturação pode-se sugerir uma grande diminuição na atividade do promotor pBC, o que também foi observado na expressão do gene *GmFAD2-1A*. Embora a expressão do gene *GmFAD2-1A* tenha sido superior à do gene *BC* na semente madura da variedade CD 2013PTA106B3, as conclusões são as mesmas que as obtidas para o cultivar CAC-1.

Dessa forma, pode-se sugerir que o promotor pBC apresenta elevado potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A* ao longo do desenvolvimento da semente de soja, considerando as 5 variedades analisadas no presente trabalho, que diferem quanto ao ciclo de vida e teor protéico.

5.3.2- Análise do padrão de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* utilizando o gene *EF1b* como controle endógeno

A avaliação do padrão de expressão do gene *BC*, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b*, foi feita por qRT-PCR, seguido da análise estatística dos dados obtidos.

A Tabela 10 apresenta o resumo da análise de variância da variável “expressão do gene *BC*” em função dos fatores “variedades de soja” e “estádios de desenvolvimento da semente”.

Tabela 10: Resumo da análise de variância da expressão do gene *BC*, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b* e usando o método $2^{-\Delta Ct}$ para cálculo da expressão gênica, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

FV ^{1/}	GL	Quadrados Médios
VAR	4	3.576,841*
EST	7	7.400,326*
VAR x EST	28	1.056,826 ^{ns}
Resíduo	80	724,1367
CV %		66,924

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{1/} **VAR** (Variedade): MONARCA, PTN-182, CAC-1, CD 201, CD 2013PTA106B3; **EST** (Estádio de desenvolvimento da semente de soja): 1° (0 a 75 mg), 2° (76 a 150 mg), 3° (151 a 225 mg), 4° (226 a 300 mg), 5° (301 a 375 mg), 6° (376 a 450 mg), 7° (451 a 525 mg) e 8° (sementes maduras).

Verifica-se que houve efeito significativo para ambos os fatores, não ocorrendo interação significativa entre eles ($p < 0,05$). Dessa forma, cada um dos fatores foi estudado separadamente através do teste de Tukey. O estudo do fator “variedades de soja” (Tabela 11 e Figura A12 do Anexo) mostrou que o cultivar MONARCA apresentou maior padrão de expressão do gene *BC* em relação à CAC-1 e CD 201, independente dos estádios considerados. Ao estudar o fator “estádios de desenvolvimento da semente” (Tabela 11 e Figura A13 do Anexo), valores superiores de expressão gênica foram encontrados nos estádios 2, 3, 4 e 7 quando comparado à semente madura, independente das variedades consideradas. Além disso, a expressão gênica no último estágio foi considerada quase nula em relação à de todos os demais estádios, exceto ao 6°, que não diferiu estatisticamente do 8°.

Tabela 11: Valores médios de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão do gene *BC*, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b*, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

EST (Estádio de desenvolvimento da semente)	VAR (Variedade)					Médias
	MONARCA	PTN-182	CAC-1	CD 201	CD 2013PTA106B3	
1°	25,9891	38,6751	11,3450	44,5549	52,4436	34,6016 c
2°	78,0898	49,4191	34,7062	56,0823	110,4955	65,7586 ab
3°	84,0760	56,2622	42,2430	81,1723	92,2369	71,1981 a
4°	84,1373	34,2394	36,4395	30,9286	31,7320	43,4954 abc
5°	74,6877	36,1265	33,1393	15,1476	25,7167	36,9636 bc
6°	36,3110	40,6927	39,5810	3,7678	14,0253	26,8756 cd
7°	71,2619	60,2391	26,4783	2,8033	52,3330	42,6231 abc
8°	0,1297	0,4621	0,0419	0,0835	0,0782	0,1591 d
Médias	56,8353 A	39,5145 AB	27,9968 B	29,3175 B	47,3827 AB	-

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fazendo-se um paralelo entre a concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina (Tabela 5 e Figura A3 do Anexo) e o padrão de expressão do gene *BC* ao longo dos 8 estádios de desenvolvimento da semente independente das variedades (Tabela 11 e Figura A13 do Anexo) verificou-se que, em relação à semente madura, no 2º estágio houve um dos maiores padrões de expressão do gene *BC* enquanto uma das menores concentrações da subunidade α foi encontrada nesse estágio. A partir do 3º estágio em direção ao final da maturação verificou-se, de forma geral, um aumento na concentração do polipeptídeo, enquanto valores superiores de expressão gênica foram encontrados em alguns desses estádios (3º, 4º e 7º) em relação à semente madura. No entanto, enquanto uma concentração alta e significativa da subunidade α foi encontrada no 8º estágio, a expressão do gene *BC* na semente madura foi quase nula quando comparada a de todos os demais estádios, exceto o 6º. Correlacionando a concentração da subunidade α da β -conglícinina (Tabela 5 e Figura A2 do Anexo) com o perfil de expressão do gene *BC* entre as cinco variedades independente dos estádios de maturação da semente (Tabela 11 e Figura A12 do Anexo), pode-se destacar CAC-1 como sendo um dos cultivares em que foram encontradas uma das menores concentrações da subunidade α comparado com as demais variedades e um dos menores padrões de expressão do gene *BC* em relação à MONARCA. Esses resultados são muito similares aos obtidos usando-se o gene *GAPDH* como normalizador da expressão do gene *BC*.

Ao comparar as variedades que diferem quanto à porcentagem de proteína total (Tabela 3 e Figura A1 do Anexo) em relação ao padrão de expressão do gene *BC* entre as variedades independente dos estádios de maturação da semente (Tabela 11 e Figura A12 do Anexo), os resultados relativos aos cultivares MONARCA, PTN-182, CD 201 e CD 2013PTA106B3 foram exatamente os mesmos de quando a expressão do gene *BC* foi normalizada com o endógeno *GAPDH*. Da mesma forma, o cultivar CAC-1 também mostrou menor padrão de expressão gênica do que a variedade MONARCA, embora isso tenha sido verificado em todos os 8 estádios.

Ao comparar o grupo de variedades de ciclo tardio com o de ciclo precoce em relação ao perfil de expressão do gene *BC* entre as variedades independente dos estádios de desenvolvimento da semente (Tabela 11 e Figura A12 do Anexo) verificou-se que somente a variedade MONARCA (ciclo tardio) se destacou em relação à CAC-1 (ciclo

tardio) e CD 201 (ciclo precoce) apresentando maior padrão de expressão do gene *BC*. Entretanto, assim como para os resultados obtidos usando o gene *GAPDH* como endógeno, não foi encontrado um padrão de expressão do gene *BC* que permitisse diferenciar um grupo do outro quanto ao perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento da semente.

Com o objetivo de determinar se os dois genes endógenos (*GAPDH* e *EF1b*) normalizaram os dados de expressão do gene *BC* de forma semelhante, gerando padrões de expressão gênica similares nas duas situações considerando as 5 variedades de soja e os 8 estádios de desenvolvimento da semente, foi feita uma comparação entre os resultados do perfil de expressão do gene *BC* normalizados a partir dos dois controles endógenos. Apesar de pequenas diferenças, pode-se dizer que o padrão de expressão do gene *BC* foi, de forma geral, muito similar nos experimentos utilizando *GAPDH* (Tabela 7 e Figuras A8 e A9 do Anexo) e *EF1b* (Tabela 11 e Figuras A12 e A13 do Anexo).

Devido à não ocorrência de interação significativa entre os fatores “variedades de soja” e “estádios de desenvolvimento da semente” quando o gene *EF1b* foi usado como normalizador, pode-se concluir que nas 5 variedades os maiores valores de expressão do gene *BC* foram encontrados, principalmente, em estádios do início e meio da maturação (2°, 3°, 4° e 7°) quando comparado à semente madura. Quando *GAPDH* foi usado como endógeno, os maiores valores de expressão do gene *BC* foram encontrados nos estádios 2 e 3 em relação ao 8° estágio. Pequenas diferenças foram observadas em relação aos resultados obtidos para as duas variedades de ciclo precoce (CD 201 e CD 2013PTA106B3). Quando o gene endógeno foi *GAPDH*, os maiores valores de expressão gênica ocorreram nos estádios 2 e 3 em relação a todos os estádios posteriores de maturação da semente (4° ao 8°) para ambas as variedades. No entanto, quando o gene *EF1b* foi utilizado como normalizador, esses maiores níveis de expressão gênica (2°, 3°, 4° e 7°) ocorreram em relação à semente madura. Considerando os dois genes endógenos, a expressão no último estágio foi considerada quase nula quando comparada à de vários outros estádios (*GAPDH*: 2° e 3° / *EF1b*: 1° ao 5° e 7°) para as 5 variedades. Independente do estágio considerado, o cultivar MONARCA apresentou um maior padrão de expressão do gene *BC* em relação à CAC-1 e CD 201 quando *EF1b* foi o normalizador. Um padrão muito semelhante foi observado quando *GAPDH* foi o

controle endógeno, com a variedade MONARCA estando sempre presente entre os cultivares de maior expressão do gene *BC* ao longo de todos os 8 estádios, sendo essa expressão gênica superior à dos cultivares CAC-1 (2° e 3° estádios) e CD 201 (4°, 5° e 7°). De modo geral, pode-se concluir que para o gene *BC* ambos os controles endógenos geraram resultados de padrão de expressão gênica muito similares.

Da mesma forma, pode-se dizer que a correlação do padrão de expressão do gene *BC* com a concentração da subunidade α da β -conglucina durante a maturação da semente e a comparação da expressão gênica entre variedades que diferem quanto à porcentagem de proteína total e o ciclo de vida, não mostrou diferenças significativas nos resultados obtidos com o uso dos dois controles endógenos.

Posterior à análise do padrão de expressão do gene *BC*, foi avaliado o perfil de expressão do gene *GmFAD2-1A*, também usando *EF1b* como controle endógeno. A Tabela 12 mostra o resumo da análise de variância da variável “expressão do gene *GmFAD2-1A*” em função dos fatores “variedades de soja” e “estádios de desenvolvimento da semente”.

Tabela 12: Resumo da análise de variância da expressão do gene *GmFAD2-1A*, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b* e usando o método $2^{-\Delta C_t}$ para cálculo da expressão gênica, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

FV ^{1/}	GL	Quadrados Médios
VAR	4	33,10895*
EST	7	89,25352*
VAR x EST	28	21,09194*
Resíduo	80	8,589527
CV %		58,101

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{1/} **VAR** (Variedade): MONARCA, PTN-182, CAC-1, CD 201, CD 2013PTA106B3; **EST** (Estádio de desenvolvimento da semente de soja): 1° (0 a 75 mg), 2° (76 a 150 mg), 3° (151 a 225 mg), 4° (226 a 300 mg), 5° (301 a 375 mg), 6° (376 a 450 mg), 7° (451 a 525 mg) e 8° (sementes maduras).

Verifica-se que houve interação significativa entre os dois fatores analisados a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Desdobrando-se a interação e procedendo-se ao teste de médias (Tukey), ao estudar o fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente” (Tabela 13 e Figura A14 do Anexo) observou-se que, em grande parte dos estádios (1º, 4º, 5º, 6º e 8º) a expressão do gene *GmFAD2-1A* não diferiu estatisticamente entre as 5 variedades dentro de cada um desses estádios. O padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* foi exatamente o mesmo dentro dos estádios 2 e 3: CD 2013PTA106B3 apresentou valores superiores quando comparado às três variedades de ciclo tardio (MONARCA, PTN-182 e CAC-1). No 7º estádio, PTN-182 e CD 2013PTA106B3 mostraram valores mais elevados de expressão gênica do que o cultivar CD 201.

O estudo do fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja” (Tabela 13 e Figura A15 do Anexo) mostrou que, em relação à semente madura, os maiores padrões de expressão do gene *GmFAD2-1A* ocorreram em estádios do meio para o final da maturação nas variedades MONARCA (5º estádio) e PTN-182 (5º ao 7º). Para CAC-1, o padrão de expressão gênica não diferiu entre todos os 8 estádios de enchimento do grão. O cultivar CD 201 mostrou valores superiores em estádios do meio da maturação (3º e 4º), enquanto sua isolinha apresentou maior diversidade, com os valores mais elevados de expressão gênica sendo observados em estádios do início, meio e final da maturação (2º, 3º, 4º e 7º), quando comparados ao último estádio. Para todas as variedades, exceto CAC-1, o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* na semente madura foi quase nulo quando comparado aos estádios de maior expressão gênica.

Tabela 13: Valores médios de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão do gene *GmFAD2-1A*, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b*, em função de diferentes variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente.

EST (Estádio de desenvolvimento da semente)	VAR (Variedade)				
	MONARCA	PTN-182	CAC-1	CD 201	CD 2013PTA106B3
1°	2,0408 A ab	2,3004 A bc	2,0937 A a	3,5617 A abc	5,1154 A abc
2°	3,2940 B ab	2,5484 B bc	2,6388 B a	5,9564 AB abc	10,9351 A ab
3°	4,2633 B ab	4,2896 B bc	5,6775 B a	7,8433 AB ab	12,4084 A a
4°	6,7017 A ab	4,4390 A bc	6,3105 A a	8,7590 A a	8,4288 A ab
5°	7,8906 A a	8,3844 A ab	5,9767 A a	4,1436 A abc	5,0178 A abc
6°	4,0419 A ab	7,6930 A ab	6,8672 A a	1,0815 A bc	4,2456 A bc
7°	7,2956 ABC ab	13,5228 A a	4,7105 BC a	1,4021 C abc	9,2556 AB ab
8°	0,1632 A b	0,1634 A c	0,1367 A a	0,0556 A c	0,1185 A c

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De forma geral, observando-se a Tabela 13 e as Figuras A14 e A15 (Anexo) verificou-se que em 5 dos 8 estádios de desenvolvimento da semente (1°, 4°, 5°, 6° e 8°), ou seja, em 62,5% dos estádios, o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* não diferiu entre as 5 variedades dentro de cada um deles. Nos demais estádios, o cultivar CD 2013PTA106B3 se destacou apresentando valores superiores de expressão gênica quando comparado às três variedades de ciclo tardio (2° e 3°) e à CD 201 (7°). A expressão gênica na semente madura foi inferior à de vários estádios do meio e final da maturação nos cultivares MONARCA (5°), PTN-182 (5° ao 7°), CD 201 (3° e 4°) e CD 2013PTA106B3 (2°, 3°, 4° e 7°), exceto para CAC-1 que não diferiu na expressão do gene *GmFAD2-1A* durante toda a maturação.

Assim como para o gene *BC*, foi feita uma comparação entre os resultados do padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* normalizados a partir dos dois controles endógenos, com o objetivo de determinar se houve alteração no perfil de expressão desse gene durante o desenvolvimento da semente nas 5 variedades de soja quando os dados foram normalizados com cada um dos genes de referência. Apesar de pequenas diferenças, pode-se dizer que o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* foi, de forma geral, muito similar nos experimentos utilizando *GAPDH* (Tabela 9 e Figuras A10 e A11 do Anexo) e *EF1b* (Tabela 13 e Figuras A14 e A15 do Anexo).

Quando o gene *EF1b* foi utilizado como endógeno verificou-se que, em grande parte dos estádios (1°, 4°, 5°, 6° e 8°), o padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* não diferiu entre as 5 variedades dentro de cada um deles, o mesmo sendo encontrado em 3 dos 8 estádios (1°, 4° e 8°) quando o gene de referência foi o *GAPDH*. Além disso, nos estádios 2 e 3, CD 2013PTA106B3 mostrou valores superiores de expressão gênica em relação às três variedades de ciclo tardio considerando-se ambos os controles endógenos. Comparado à semente madura, quando o gene *EF1b* foi usado como controle endógeno, os maiores valores de expressão de *GmFAD2-1A* ocorreram em estádios do meio para o final da maturação nas variedades MONARCA (5°) e PTN-182 (5° ao 7°), o mesmo ocorrendo quando o gene *GAPDH* foi o normalizador (MONARCA: 3°, 4°, 5° e 7° / PTN-182: 3° ao 7°). Pequenas diferenças foram encontradas considerando-se a variedade CAC-1: quando o endógeno foi *GAPDH*, a expressão do gene *GmFAD2-1A*

no 8º estágio foi inferior à dos estágios de 3 a 6, enquanto essa diferença não ocorreu quando o normalizador foi *EF1b*.

Em relação aos dois cultivares de ciclo precoce, os maiores padrões de expressão do gene *GmFAD2-1A* ocorreram, principalmente, em estágios do início e meio da maturação da semente considerando os dois genes de referência: estágios 2 e 3 para ambas as variedades quando o normalizador foi *GAPDH*; estágios 3 e 4 (CD 201) e 2, 3, 4 e 7 (CD 2013PTA106B3) quando o endógeno foi *EF1b*. No entanto, quando o gene *EF1b* foi utilizado como endógeno, esses maiores valores de expressão gênica ocorreram em relação à semente madura, ao passo que quando o normalizador foi o *GAPDH* isso ocorreu em relação a outros estágios além do 8º (CD 201: 5º ao 8º / CD 2013PTA106B3: 1º e 4º ao 8º). Esse baixo padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* em estágios do meio para o final da maturação nas variedades de ciclo precoce também foi verificado para o gene alvo *BC* quando o normalizador foi *GAPDH*. De forma geral, pode-se concluir que o padrão de expressão de *GmFAD2-1A* ao longo dos 8 estágios de desenvolvimento da semente nas 5 variedades de soja foi similar quando *GAPDH* ou *EF1b* foram utilizados como controles endógenos, apresentando pequenas diferenças nos perfis de expressão gênica em estágios do meio e final da maturação nas variedades de ciclo precoce, o mesmo fato sendo observado em relação ao gene *BC*. Esse resultado poderia ser explicado por uma diferença no padrão de expressão dos dois genes de referência ao longo desses estágios de desenvolvimento da semente nas variedades CD 201 e CD 2013PTA106B3.

Uma vez que os padrões de expressão dos genes alvos *BC* e *GmFAD2-1A* foram muito similares utilizando *GAPDH* ou *EF1b* como controle endógeno, pode-se sugerir que na análise da expressão dos genes alvos utilizando *EF1b* como normalizador o promotor pBC também apresentou potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética de soja que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A* ao longo de toda a maturação da semente, em concordância com os resultados obtidos quando o gene de referência foi *GAPDH*.

A escolha do gene *EF1b* foi baseada em resultados obtidos por Hu *et al.* (2009) que, na tentativa de identificar os genes endógenos mais apropriados para normalização da expressão gênica em soja, identificaram o *EF1b* como sendo um dos 4 genes de

referência mais estavelmente expresso, principalmente quando foram considerados diferentes estádios de desenvolvimento de sementes e folhas, o que também foi encontrado em estudos anteriores (Jian *et al.*, 2008). De acordo com Hu *et al.* (2009) seriam necessários 4 genes de referência para uma efetiva normalização da expressão gênica em estudos envolvendo diferentes estádios de desenvolvimento da soja.

No presente trabalho, ao analisar os valores médios de Ct dos dois controles endógenos verificou-se que o gene *GAPDH* apresentou menor variação nos valores médios de Ct ao longo dos 8 estádios de maturação da semente nas 5 variedades de soja (CV=2,28%) quando comparado ao *EF1b* (CV=5,07%), o qual mostrou uma variação duas vezes maior nesses valores, de tal forma que a expressão do gene *GAPDH* permaneceu mais constante durante os experimentos. Esses resultados relativos à estabilidade de expressão do gene *EF1b* estão de acordo com os obtidos por Hu *et al.* (2009), que encontraram um CV= 5,6% para esse gene no estudo de vários grupos de amostras de soja. Além disso, a eficiência da reação de qRT-PCR relativa ao gene *GAPDH* (92,72%) foi superior à de *EF1b* (89,58%) (Figura A5 do Anexo). Por isso, conclui-se que o gene *GAPDH* foi melhor normalizador dos dados de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* para as variedades de soja e estádios de desenvolvimento da semente considerados no presente trabalho, uma vez que esse gene apresentou expressão mais estável entre todos os tratamentos. Segundo Hu *et al.* (2009), ao comparar o padrão de expressão de vários genes de referência ao longo de um grande número de amostras de soja, concluíram que nenhum dos genes foi uniformemente expresso em todas as condições experimentais e os genes endógenos mais apropriados eram dependentes da condição de crescimento da planta, tecidos, estádios de desenvolvimento e cultivar. Isso explica para a pequena variação observada no padrão de expressão dos genes *GAPDH* e *EF1b*, uma vez que foram considerados dois tipos de tratamentos: diferentes estádios de desenvolvimento da semente e diferentes variedades de soja.

Estudos com promotores de genes das subunidades da β -conglícinina com o objetivo de dirigir a expressão de transgenes de maneira semente-específica foram relatados. Chiera *et al.* (2004) alteraram o conteúdo de fitato (IP₆) da semente de soja através da super-expressão do gene que codifica para a enzima fitase de soja (*GmPhy*) sob controle do promotor do gene da subunidade α' da β -conglícinina. Foi verificada

uma redução de 12,6 a 24,8% nos níveis de IP₆ nas sementes transgênicas quando comparada com a planta controle e um aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de fósforo livre, que é armazenado nas sementes na forma de fítico. Durante o desenvolvimento da semente de soja, o padrão de expressão do gene *GmPhy* foi similar ao do gene da subunidade α' da β -conglícinina como era esperado devido à utilização do promotor do gene dessa subunidade na construção do cassete de expressão, com ambos os genes apresentando elevada expressão em estádios do meio da maturação. Em virtude dos promotores dos genes das subunidades α e α' apresentarem vários *cis*-elementos em comum (Qinggele *et al.*, 2007), pode-se supor que um resultado semelhante de controle espacial e temporal da expressão do transgene seria observado com o uso do promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina.

Um grande número de estudos referentes ao silenciamento do gene *FAD2-1* envolvendo a utilização de promotores semente-específicos foram publicados nos últimos anos. Todos tiveram como meta alterar a composição de ácidos graxos da semente, aumentando o conteúdo de ácido oléico e a estabilidade oxidativa do óleo produzido.

Liu *et al.* (2002 e 2000), através do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) dos genes *GhSAD-1* (estearoil-CoA dessaturase plastidial) e *GhFAD2-1* modificaram a composição de ácidos graxos do óleo obtido a partir da semente de algodão. Para isso, foram construídos cassetes de expressão contendo o cDNA do gene *GhSAD-1* ou *GhFAD2-1* de algodão, na orientação “*antisense*” ou “repetição invertida”, sob controle do promotor lectina de soja (semente-específico). Em plantas de algodão transformadas com os cassetes de expressão contendo o transgene na orientação “repetição invertida”, o silenciamento do gene *GhSAD-1* aumentou os níveis de ácido esteárico de 2-3% para até 40%, e o PTGS do gene *GhFAD2-1* resultou em um aumento no conteúdo do ácido oléico de 15% para até 77%. Além disso, os níveis de ácido palmítico foram significativamente reduzidos em ambos os casos, de 26% para 15%. Análises da concentração dos ácidos graxos nas folhas de algodão de plantas transgênicas não mostraram diferença em relação ao cultivar selvagem, indicando que o silenciamento gênico ocorreu somente nas sementes como era esperado a partir do uso de um promotor semente-específico para dirigir a expressão do transgene. Resultados

similares foram obtidos em plantas transformadas com as construções *antisense*, entretanto com uma eficiência de silenciamento gênico menor. De acordo com esses autores, o PTGS desses genes aparentemente não prejudicou o desenvolvimento e germinação da semente ou o crescimento da nova planta.

Sunilkumar *et al.* (2005) transformaram plantas de algodão com um cassete de expressão contendo o gene *GhFAD2-1* sob controle do promotor semente-específico do gene da α -globulina B. O nível de ácido oléico em algumas plantas transgênicas aproximadamente dobrou (29%) em relação ao das plantas selvagens (15%), com uma conseqüente diminuição no conteúdo do ácido linoléico, sendo que não houve uma diferença significativa nos níveis dos outros ácidos graxos. Além disso, esses autores verificaram que a atividade do promotor endógeno do gene da α -globulina B, que controla a expressão do gene de uma das principais proteínas de reserva da semente de algodão, não foi afetada de forma negativa pela introdução do mesmo promotor para a expressão do transgene.

Stoutjesdijk *et al.* (2000), através do silenciamento do gene que codifica para a enzima ω -6 dessaturase em duas espécies de canola, *Brassica napus* e *Brassica juncea*, produziram plantas transgênicas com níveis superiores de ácido oléico e inferiores de ácido linoléico quando comparadas às plantas selvagens. O transgene estava sob controle do promotor semente-específico *napin*. Para *Brassica napus*, o conteúdo de ácido oléico foi de até 89% nas sementes transgênicas em relação ao nível normal de 63%, enquanto para *Brassica juncea* esses valores foram de até 73% em relação ao nível normal de 42%.

Kinney (1995 e 1996), através do silenciamento do gene *GmFAD2-1*, produziu óleos de soja com um conteúdo total de ácidos graxos polinsaturados menor do que 5% e com aproximadamente 85% de ácido oléico, além um teor de ácido palmítico de cerca de 7% comparado com 11% no óleo comercial. O cassete de expressão usado na transformação continha o gene *GmFAD2-1* de soja sob controle do promotor semente-específico do gene da subunidade α' da β -conglícinina.

Todos esses resultados comprovam o potencial de promotores semente-específicos para serem usados na transformação genética de plantas que têm como

objetivo super-expressar ou silenciar importantes genes, para melhorar a qualidade nutricional da semente e aumentar o seu valor agronômico.

6- CONCLUSÕES

De modo geral, a concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina foi inferior em estádios iniciais de desenvolvimento da semente (1° e 2°), aumentando em estádios do meio para o final da maturação, indicando que ocorreu um acúmulo desse polipeptídeo ao longo do enchimento do grão para todas as 5 variedades, apresentando uma concentração alta e significativa na semente madura. MONARCA e CD 201 apresentaram concentrações superiores do polipeptídeo quando comparadas com suas respectivas isolinhas de maiores teores protéicos, PTN-182 e CD 2013PTA106B3, o que ocorreu em estádios do meio para o final da maturação. Não foi encontrado um padrão de concentração da subunidade α que permitisse diferenciar o grupo de variedades de ciclo tardio do grupo de ciclo precoce quanto à concentração desse polipeptídeo ao longo do desenvolvimento da semente de soja.

Os dois genes endógenos (*GAPDH* e *EF1b*) normalizaram os dados de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* de modo muito similar, com pequenas diferenças ocorrendo nos perfis de expressão dos dois genes alvos em estádios do meio e final da maturação nas variedades de ciclo precoce. Entretanto, *GAPDH* foi melhor normalizador do que *EF1b*, mostrando expressão mais estável entre todos os tratamentos.

De forma geral, o gene *BC* apresentou maior padrão de expressão em estádios do início e meio da maturação, principalmente nos estádios 2 e 3, sendo que em vários estádios posteriores houve uma diminuição na expressão gênica e na semente madura a expressão foi considerada quase nula para todas as 5 variedades. Dessa forma, pode-se sugerir que o promotor do gene da subunidade α da β -conglícinina (promotor pBC) apresentou atividade máxima para ativar a transcrição do gene *BC* em estádios do início e meio da maturação. Em estádios posteriores do desenvolvimento da semente pode-se sugerir que a atividade do promotor pBC diminuiu, mas ele ainda permanece suficientemente ativo para garantir um nível alto de expressão do transgene em futuros experimentos de transformação genética de soja. Na semente madura, pode-se sugerir que o promotor pBC apresentou atividade extremamente baixa.

De modo geral, a concentração da subunidade α da proteína β -conglícinina foi inferior em estádios iniciais da maturação (1° e 2°), enquanto o gene *BC* apresentou

maior padrão de expressão em estádios do início e meio do desenvolvimento da semente (2° e 3°). A partir do 3° estágio em direção ao final da maturação, houve um aumento na concentração do polipeptídeo enquanto verificou-se uma diminuição na expressão do gene *BC* em vários desses estádios. A principal diferença foi encontrada na semente madura de todas as variedades que apresentou uma concentração relativamente alta e significativa da subunidade α , apesar de uma expressão quase nula do gene *BC*.

Não houve diferença na expressão do gene *BC* quando comparou-se uma variedade de soja e sua respectiva isolinha de maior teor protéico ao longo do desenvolvimento da semente.

De forma geral, não foi encontrado um padrão de expressão do gene *BC* que permitisse diferenciar o grupo de variedades de ciclo tardio do grupo de ciclo precoce quanto ao perfil de expressão gênica ao longo do desenvolvimento da semente.

Em relação ao gene *GmFAD2-1A*, de modo geral, as variedades de ciclo tardio (MONARCA, PTN-182 e CAC-1) apresentaram maior padrão de expressão gênica em estádios do meio e final da maturação. Os cultivares de ciclo precoce (CD 201 e CD 2013PTA106B3) mostraram os maiores valores de expressão do gene *GmFAD2-1A* em estádios do início e meio do desenvolvimento da semente, principalmente nos estádios 2 e 3. Assim como para o gene *BC*, a expressão de *GmFAD2-1A* foi quase nula na semente madura para todas as 5 variedades.

De modo geral, a correlação entre o padrão de expressão dos genes *BC* e *GmFAD2-1A* nas variedades de ciclo tardio (MONARCA, PTN-182 e CAC-1) mostrou que nos estádios em que houve maior taxa de transcrição do gene *GmFAD2-1A* a expressão do gene *BC* diminuiu após atingir um pico de expressão no 3° estágio. Entretanto, a expressão do gene *BC* foi ainda superior à do gene *GmFAD2-1A* nesses estádios. Dessa forma, para os cultivares MONARCA, PTN-182 e CAC-1, nos estádios em que o gene *GmFAD2-1A* apresentou os maiores valores de expressão pode-se sugerir que o promotor pBC está ativo ou com uma capacidade máxima para ativar a transcrição do gene alvo. Nos cultivares de ciclo precoce (CD 201 e CD 2013PTA106B3), essa correlação mostrou que os genes *BC* e *GmFAD2-1A* apresentaram um padrão de expressão semelhante, com valores elevados de expressão gênica em estádios do início e meio da maturação (2° e 3°), diminuindo em estádios posteriores de desenvolvimento da

semente. Portanto, pode-se sugerir que a maior atividade do promotor pBC ocorreu nos mesmos estádios em que foram encontrados os maiores valores de expressão do gene *GmFAD2-1A*. De forma geral, na semente madura de todas as cinco variedades a expressão de ambos os genes foi quase nula.

Dessa forma, pode-se sugerir que o promotor do gene da subunidade α da β -conglucina apresenta elevado potencial para ser usado em futuros experimentos de transformação genética que tenha como objetivo silenciar o gene *GmFAD2-1A* ao longo do desenvolvimento da semente de soja, considerando os 5 cultivares analisados no presente trabalho.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbadi, A.; Domerg, F.; Bauer, J.; Napier, J. A.; Weltri, R.; Zähringer, U.; Cirpus, P. e Heinz, E. Biosynthesis of Very-Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Transgenic Oilseeds: Constraints on Their Accumulation. **The Plant Cell**, 16: 2734-2748, 2004.

ABIOVE: Disponível em < <http://www.abiove.com.br/> > Acessado em janeiro de 2010.

Allison, D. B.; Denke, M. A.; Dietschy, J. M.; Emken, E. A. e Nicolosi, R. J. Trans fatty acids and coronary heart disease risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, 62: 655-707, 1995.

Ambros, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, 431: 350-355, 2004.

American Society of Clinical Nutrition: Task Force on Trans Fatty Acids. Position Paper. **American Journal of Clinical Nutrition**, 63: 663-670, 1996.

Anai, T.; Yamada, T.; Hideshima, R.; Kinoshita, T.; Rahman, S. M. e Takagi, Y. Two high-oleic-acid soybean mutants, M23 and KK21, have disrupted microsomal Omega-6 fatty acid desaturase, encoded by *GmFAD2-1a*. **Breeding Science**, 58: 447-452, 2008.

Ascherio, A.; Willett, W. C. New directions in dietary studies of coronary heart disease. **The Journal of Nutrition**, 125: 647-655, 1995.

Barro, F.; Rooke, L.; Bekes, F.; Gras, P.; Tatham, A. S.; Fido, R.; Lasserri, P.; Shewry, P. R. e Barcelo, P. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. **Nature Biotechnology**, 15: 1295-1299, 1997.

Battraw, M. J. e Hall, T. C. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. **Plant Molecular Biology**, 15: 527-538, 1990.

Baulcombe, D. C. RNA silencing in plants. **Nature**, 431: 356-363, 2004.

Baulcombe, D. C. Short silencing RNA: the dark matter of genetics? **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, 71: 13-20, 2006.

Bäumlein, H.; Nagy, I.; Villarroel, R.; Inzé, D. e Wobus, U. *Cis*-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. **Plant Journal**, 2: 233-239, 1992.

Beachy, R. N.; Chen, Z. L.; Horsch, R. B.; Rogers, S. G.; Hoffman, N. J. e Fraley, R. T. Accumulation and assembly of soybean β -conglycinin in seeds of transformed petunia plants. **The EMBO Journal**, 4: 3047-3053, 1985.

Beard, J. L.; Burton, J. W. e Theil E. C. Purified ferritin and soybean meal can be sources of iron for treating iron deficiency in rats. **The Journal of Nutrition**, 126: 154-160, 1996.

Benfey, P. N.; Ren, L. e Chua, N. H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. **The EMBO Journal**, 9: 1677-1684, 1990.

Bray, E. A. e Beachy, R. N. Regulation by ABA of β -conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. **Plant Physiology**, 79: 746-750, 1985.

Breitbart, R. E.; Andreatis, A. e Nadal-Ginard, B. Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. **Annual Review of Biochemistry**, 56: 467-496, 1987.

Bruner, A. C.; Jung, S.; Abbott, A. G. e Powell, G. L. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to asparagines. **Crop Science**, 41: 522-526, 2001.

Bustos, M. M.; Guiltinan, M. J.; Jordano, J.; Begum, D.; Kalkan, F. A. e Hall, T. C. Regulation of beta-glucuronidase expression in transgenic tobacco plants by an A/T-rich, *cis*-acting sequence found upstream of a French bean beta-phaseolin gene. **The Plant Cell**, 1: 839–853, 1989.

Bustos, M. M.; Begum, D.; Kalkan, F. A.; Battraw, M. J. e Hall, T. C. Positive and negative *cis*-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene-expression by a seed storage protein promoter. **The EMBO Journal**, 10: 1469-1479, 1991.

Chen, Z. L.; Pan, N.-S. e Beachy, R. N. A DNA sequence element that confers seed specific enhancement to a constitutive promoter. **The EMBO Journal**, 7 (2): 297-302, 1988.

Chen, Z. L.; Naito, S.; Nakamura, I. e Beachy, R. N. Regulated expression of genes encoding soybean beta-conglycinins in transgenic plants. **Developmental Genetics**, 10: 112-122, 1989.

Chiera, J. M.; Finer, J. J. e Grabau, E. A. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability. **Plant Molecular Biology**, 56: 895-904, 2004.

Coates, J. B.; Medeiros, J. S.; Thanh, V. H. e Nielsen, N. C. Characterization of the subunits of β -conglycinin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 243: 184-194, 1985.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira (grãos): quarto levantamento, janeiro de 2010/ Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília: Conab, 2010. Disponível também em www.conab.gov.br

Dickinson, C. D.; Evans, R. P. e Nielsen, N. C. RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. **Nucleic Acids Research**, 16: 371, 1988.

Doyle, J. J.; Schuler, M. A.; Godette, W. D.; Zenger, V.; Beachy, R. N. e Slightom, J. L. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*: Structural homologies of genes and proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 261: 9228-9238, 1986.

Dunwell, J. M. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, 51: 487-496, 2000.

Elmayan, T. e Vaucheret, H. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. **The Plant Journal**, 9: 787-797, 1996.

Ezcurra, I.; Ellerström, M.; Wycliffe, P.; Stålberg, K. e Rask, L. Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. **Plant Molecular Biology**, 40: 699-709, 1999.

Filipowicz, W.; Jaskiewicz, L.; Kolb, F. A. e Pillai, R. S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. **Current Opinion in Structural Biology**, 15: 331-341, 2005.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E. e Mello, C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 391: 806-811, 1998.

Flores, T.; Karpova, O.; Su, X.; Zeng, P.; Bilyeu, K.; Sleper, D. A.; Nguyen, H. T. e Zhang, Z. J. Silencing of *GmFAD3* gene by siRNA leads to low α -linolenic acids (18:3) of *fad3*-mutant phenotype in soybean [*Glycine max* (Merr.)]. **Transgenic Research**, 17 (5): 839-850, 2008.

Funarbe – SAEG. Sistema para Análises Estatísticas. Versão 9.1. Viçosa, 1993.

Gardner, C. D. e Kraemer, H. C. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids: a meta-analysis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 15: 1917-1927, 1995.

Gayler, K. R. e Sykes, G. E. β -Conglycinin in developing soybean seeds. **Plant Physiology**, 67: 958-961, 1981.

Goldberg, R. B.; Hoschek, G.; Ditta, G. S. e Breidenbach, R. W. Developmental regulation of cloned superabundant embryo mRNAs in soybean. **Developmental Biology**, 83: 218-231, 1981.

Goto, F.; Yoshiara, T.; Shigemoto, N.; Toki, S. e Takaiwa, F. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. **Nature Biotechnology**, 17: 282-286, 1999

Haley, B. e Zamore, P. D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. **Nature Structural & Molecular Biology**, 11: 599-606, 2004.

Harada, J. J.; Baker, S. J. e Goldberg, R. B. Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. **The Plant Cell**, 1: 415-425, 1989.

Heppard, E. P; Kinney, A. J.; Stecca, K. L. e Miao, G-H. Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal ω -6 Desaturase Genes in Soybeans. **Plant Physiology**, 110: 311-319, 1996.

Hernández, M. L.; Padilla, M. N.; Mancha, M. e Martinez-Rivas, J. M. Expression Analysis Identifies *FAD2-2* as the Olive Oleate Desaturase Gene Mainly Responsible for the Linoleic Acid Content in Virgin Olive Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57: 6199-6206, 2009.

Hernández, M. L.; Mancha, M. e Martinez-Rivas, J. M. Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (*FAD2*) from olive. **Phytochemistry**, 66: 1417-1426, 2005.

Higgins, T. J. V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology**, 35: 191-221, 1984.

Holowach, L. P.; Madison, J. T. e Thompson, J. F. Studies on the mechanism of regulation of the mRNA level for a soybean storage protein subunit by exogenous L-methionine. **Plant Physiology**, 80: 561-567, 1986.

Hou, H. J. e Chang, K. C. Structural Characteristics of Purified β -Conglycinin from Soybeans Stored under Four Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52: 7931-7937, 2004.

Hu, R.; Fan, C.; Li, H.; Zhang, Q. e Fu, Y-F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, 10 (93): 1-12, 2009.

Imoto, Y.; Yamada, T.; Kitamura, K. e Kanazawa, A. Spatial and temporal control of transcription of the soybean β -conglycinin α subunit gene is conferred by its proximal promoter region and accounts for the unequal distribution of the protein during embryogenesis. **Genes & Genetic Systems**, 83: 469-476, 2008.

Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, 3º ed., v.1, 533 p., 1985.

Jian, B.; Liu, B.; Bi, Y.; Hou, W.; Wu, C. e Han, T. Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, 9 (59): 1-14, 2008.

Katan, M. B.; Mensink, R. P. e Zock, P. L. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. **Annual Review of Nutrition**, 15: 473-496, 1995a.

Katan, M. B.; Zock, P. L. e Mensink, R. P. Dietary oils, serum lipoproteins and coronary heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, 6: 1368-1373, 1995b.

Keller, B. e Baumgartner, C. Vascular-specific expression of the bean Grp-1.8 gene is negatively regulated. **The Plant Cell**, 3: 1639-1646, 1991.

Kinney, A. J. Improving soybean seed quality. In: **Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement**, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 101-113, 1995.

Kinney, A. J. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. **Journal of Food Lipids**, 3: 273-292, 1996.

Kinney, A. J.; Cahoon, E. B. e Hitz, W. D. Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. **Biochemical Society**, 30: 1099-1103, 2002.

Kinney, A. J. Engineering Soybeans for Food and Health. **AgBioForum**, 6 (1 e 2): 18-22, 2003.

Kloti, A.; He, X.; Potrykus, I.; Hohn, T. e Futterer, J. Tissue-specific silencing of a transgene in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99: 10881-10886, 2002.

Krishnan, H. B. Biochemistry and molecular biology of soybean seed storage proteins. **Journal of New Seeds**, 2: 1-25, 2000.

Krishnan, H. B.; Natarajan, S. S.; Mahmoud, A. A. e Nelson, R. L. Identification of glycinin and β -conglycinin subunits that contribute to the increased protein content of high-protein soybean lines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 1839-1845, 2007.

Kusaba, M. RNA interference in crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 15: 139-143, 2004.

Ladin, B. F.; Tierney, M. L.; Meinke, D. W.; Hosangadi, P.; Veith, M. e Beachy, R. N. Developmental regulation of β -conglycinin in soybean axes and cotyledons. **Plant Physiology**, 84: 35-41, 1987.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

Lanna, A. C. **Efeito da temperatura sobre a regulação da síntese de ácidos graxos polinsaturados em soja**. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, MG, 84 p., 2002.

Li, L.; Wang, X.; Gai, J. e Yu, D. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. **Journal of Plant Physiology**, 164: 1516-1526, 2007.

Lipardi, C.; Wei, Q. e Paterson, B. M. RNAi as random degradative PCR: siRNA *primers* convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. **Cell**, 107: 297-307, 2001.

Livak, K. J. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, 25: 402-408, 2001.

Liu, Q.; Singh, S. e Green, A. Genetic modification of cotton seed oil using inverted-repeat gene-silencing techniques. **Biochemical Society Transactions**, 28: 927-929, 2000.

Liu, Q.; Singh, P. S. e Green, A. G. High-steric and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. **Plant Physiology**, 129: 1732-1743, 2002.

Macnamara, D. Dietary fatty acids lipoproteins and cardiovascular disease. In: **Advances in Food and Nutrition Research**, 36: 254-351, 1992.

Mahmood-ur-Rahman; Ali, I.; Husnain, T. e Riazuddin, S. RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. **Biotechnology Advances**, 26: 202-209, 2008.

Maruyama, N.; Katsube, T.; Wada, Y.; Oh, M. H.; Barba de La Rosa, A. P.; Okuda, E.; Nakagawa, S. e Utsumi, S. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean β -conglycinin in folding, assembly and structural features. **European Journal of Biochemistry**, 258: 854-862, 1998.

Maruyama, N.; Adachi, M.; Takahashi, K.; Yagasaki, K.; Kohna, M.; Takenaks, Y.; Okuda, E.; Nakagawa, S.; Mikami, B. e Utsumi, S. Crystal structures of recombinant and native soybean β -conglycinin β homotrimers. **European Journal of Biochemistry**, 268: 3595-3607, 2001.

Meinke, D. W.; Chen, J. e Beachy, R. N. Expression of storage protein genes during soybean seed development. **Planta**, 153: 130-139, 1981.

Meister, G. e Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, 431: 343-349, 2004.

Mello, C. C. e Conte, Jr. D. Revealing the world of RNA interference. **Nature**, 431: 338-342, 2004.

Mensink, R. P. e Katan, M. B. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **The New England Journal of Medicine**, 323 (7): 439-445, 1990.

Mensink, R. P.; Temme, E. H. M. e Hornstra, G. Dietary saturated and trans fatty acids and lipoproteins metabolism. **Annals of Medicine**, 26: 461-464, 1994.

Morita, S.; Fukase, M.; Yamaguchi, M.; Fukuda, Y. e Morita, Y. Purification, characterization, and crystallization of single molecular species of β -conglycinin from soybean seeds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 60: 866-873, 1996.

Naito, S.; Dube, P. H. e Beachy, R. N. Differential expression of conglycinin α' and β subunit genes in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, 11: 109-123, 1988.

Nambara, E.; Keith, K.; McCourt, P. e Naito, S. A regulatory role for the *ABI3* gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, 121: 629-636, 1995.

Natarajan, S. S.; Xu, C.; Bae, H.; Caperna, T. J. e Garrett, W. M. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (8): 3114-3120, 2006.

Natarajan, S. S.; Xu, C.; Bae, H.; Bailey, B. A.; Cregan, P.; Caperna, T. J.; Garrett, W. M. e Luthria, D. Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45: 436-444, 2007.

Nielsen, N. C.; Dickinson, C. D.; Cho, T. J.; Thanh, B. H.; Scallan, B. J.; Fischer, R. L.; Sims, T. L.; Drews, G. N. e Goldberg, R. B. Characterization of the glycinin gene family. **The Plant Cell**, 1: 313-328, 1989.

Nielsen, N. C. Soybean seed composition. In: Verma, D. P. S., Shoemaker, R. C. (Eds) **Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, 127-163, 1996.

Nodari, R. O. e Guerra, M. P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, 18 (1): 81-116, 2001.

Nykänen, A.; Haley, B. e Zamore, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell**, 107: 309-21, 2001.

Ohlrogge, J. e Browse, J. Lipid biosynthesis. **The Plant Cell**, 7: 957-70, 1995.

Osório, J.; Fernández-Martínez, J.; Mancha, M. e Garcés, R. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. **Crop Science**, 35: 739-742, 1995.

Park, W.; Li, J.; Song, R.; Messing, J. e Chen, X. CARPEL FACTORY: a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, 12: 1484-1495, 2002.

Perez-Grau, L. e Goldberg, R. B. Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. **The Plant Cell**, 1: 1095-1109, 1989.

Pickford, A. S. e Cogoni, C. RNA-mediated gene silencing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 60: 871-882, 2003.

Potenza, C.; Aleman, L. e Sengupta-Copalan, C. Targeting transgene expression in research, agricultural and environmental applications: promoters used in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 40: 1-22, 2004.

Qinggele, C.; Mingchun, L.; Dongsheng, W.; Yi, C. e Laijun, X. Isolation and sequencing analysis on the seed specific promoter from soybean. **Frontiers of Agricultural in China**, 1 (1): 17-23, 2007.

Rebetzke, G. J.; Pantalone, V. R.; Burton, J. W.; Carver, B. F. e Wilson, R. F. Phenotypic variation for saturated fatty acid content in soybean. **Euphytica**, 91: 289-295, 1996.

Scheid, O. M.; Probst, A. V.; Afsar, K. e Paszkowski, J. Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99: 13659–13662, 2002.

Schlueter, J. A.; Vasylenko-Sanders, I. F.; Deshpande, S.; Yi, J.; Siegfried, M.; Roe, B. A.; Schlueter, S. D.; Scheffler, B. E. e Shoemaker, R. C. The *FAD2* Gene Family of Soybean: Insights into the Structural and Functional Divergence of a Paleopolyploid Genome. **The Plant Genome**, 1: S14-S26, 2007.

Schuler, M. A.; Ladin, B. F.; Fryer, G.; Pollaco, J. G. e Beachy, R. N. Structural sequences are conserved in the genes coding for the α' , α , and β subunits of the soybean seed storage protein and other seed proteins. **Nucleic Acids Research**, 10: 8245-8260, 1982.

Shah, D. M.; Hightower, R. C. e Meagher, R. B. Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 79: 1022-1026, 1982.

Shintani, D. e Dellapenna, D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. **Science**, 282: 2098-2100, 1998.

Shuey, D.; McCallus, D. e Tony, G. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. **Drug Discovery Today**, 7 (20): 1040-1046, 2002.

Shuttuck-Eidens, D. M. e Beachy, R. N. Degradation of β -Conglycinin in Early Stages of Soybean Embryogenesis. **Plant Physiology**, 78: 895-898, 1985.

Sontheimer, E. J. Assembly and function of RNA silencing complexes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 6: 127-138, 2005.

Stoutjesdijk, P. A.; Hurlestone, C.; ingh, S. P. e Green, A. G. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous $\Delta 12$ -desaturases. **Biochemical Society Transactions**, 28: 938-940, 2000.

Sugimoto, T.; Momma, M.; Hashirume, K. e Saio, K. Components of storage protein in hypocotyl-radicle axis of soybean seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, 51: 1231-1238, 1987.

Sunilkumar, G.; Campbell, L. M.; Hossen, M.; Connell, J. P.; Hernandez, E.; Reddy, A. S.; Smith, C. W. e Rathore, K. S. A comprehensive study of the use of a homologous promoter in *antisense* cotton lines exhibiting a high seed oleic acid phenotype. **Plant Biotechnology Journal**, 3: 319-330, 2005.

Sykes, G. E. e Gayler, K. R. Detection and characterization of a new beta-conglycinin from soybean seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 210: 525-530, 1981.

Tang, G. e Galili, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. **Trends in Biotechnology**, 22: 463-469, 2004.

Tang, G-Q.; Novitzky, W. P.; Griffing, H. C.; Huber, S. C.; e Dewey. R. E. Oleate desaturase enzymes of soybean: Evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. **The Plant Journal**, 44: 433-446, 2005.

Thomas, J. M. G., Boote, K. J.; Allen, L. H.; Gallo-Meagher, M. e David, J. M. Seed physiology and metabolism: Elevated temperature and carbon dioxide effects on soybean seed composition and transcript abundance. **Crop Science**, 43: 1548-1577, 2003.

Tomari, Y.; Du, T.; Haley, B.; Schwarz, D. S.; Bennett, R.; Cook, H. A.; Koppetsch, B. S.; Theurkauf, W. E. e Zamore, P. D. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. **Cell**, 116: 831-841, 2004.

Voelker, T. e Kinney, A. J. Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 52: 335-361, 2001.

Walling, L.; Drews, G. N. e Goldberg, R. B. Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 83: 2123-2127, 1986.

Wang, X. M. e Hildebrand, D. F. Biosynthesis and regulation of linoleic acid higher plants. **Plant Physiology Biochemistry**, 26: 777-792, 1988.

Warner, K.; Neff, W. E.; Byrdwell, W. C. e Gardner, H. W. Effect of oleic and linoleic acids on the production of deep-fried odor in heated triolein and triolinolein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 899-905, 2001.

Waterhouse, P. M. e Helliwell, C. A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, 4: 29-38, 2002.

Woerfel, J. B. Formulation of soy oil products. **Grasas y Acietas**, 46: 357-365, 1995.

Wollett, L. A. e Dietschy, J. M. Effect of long-chain fatty acids on low-density-lipoprotein-cholesterol metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, 60: 991-996, 1994.

Yadav, N. S. Genetic modification of soybean oil quality. In: Verma, D. P. S., Shoemaker, R. C. (Eds) **Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology**. USA: CAB INTERNATIONAL, 127-188, 1996.

Yaklich, R. W. β -Conglycinin and Glycinin in High-Protein Soybean Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 729-735, 2001.

Yang, D.; Lu, H. e Erickson, J. W. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. **Current Biology**, 10: 1191-1200, 2000.

Ye, X.; Al-Babili, S.; Kloti, A.; Zhang, J.; Lucca, P.; Beyer, P. e Potrykus, I. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science**, 287: 303-305, 2000.

Yoshino, M.; Kanazawa, A.; Tsutsumi, K.; Nakamura, I. e Shimamoto, Y. Structure and characterization of the gene encoding α subunit soybean β -conglycinin. **Genes Genetics Systems**, 76: 99-105, 2001.

Yoshino, M.; Nagamatsu, A.; Tsutsumi, K. e Kanazawa, A. The regulatory function of the upstream sequence of the β -conglycinin α subunit gene in seed-specific transcription is associated with the presence of the RY sequence. **Genes Genetics Systems**, 81: 135-141, 2006.

ANEXOS

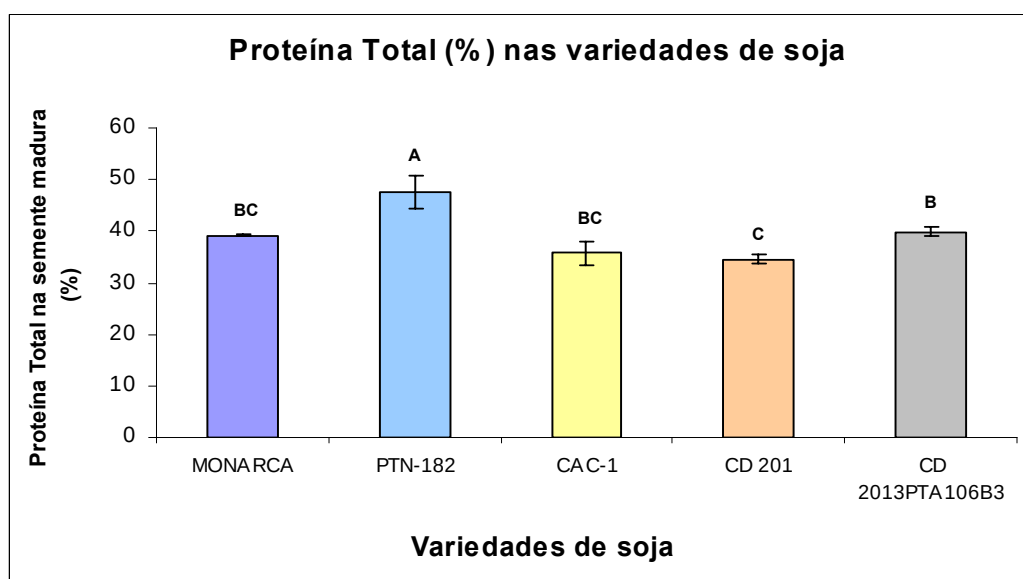


Figura A1: Porcentagem de proteína total (%PT) na semente madura das variedades de soja. A %PT foi determinada pelo método de Kjeldahl, com cada variedade analisada em triplicata. As letras maiúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 3). As barras indicam o desvio-padrão.

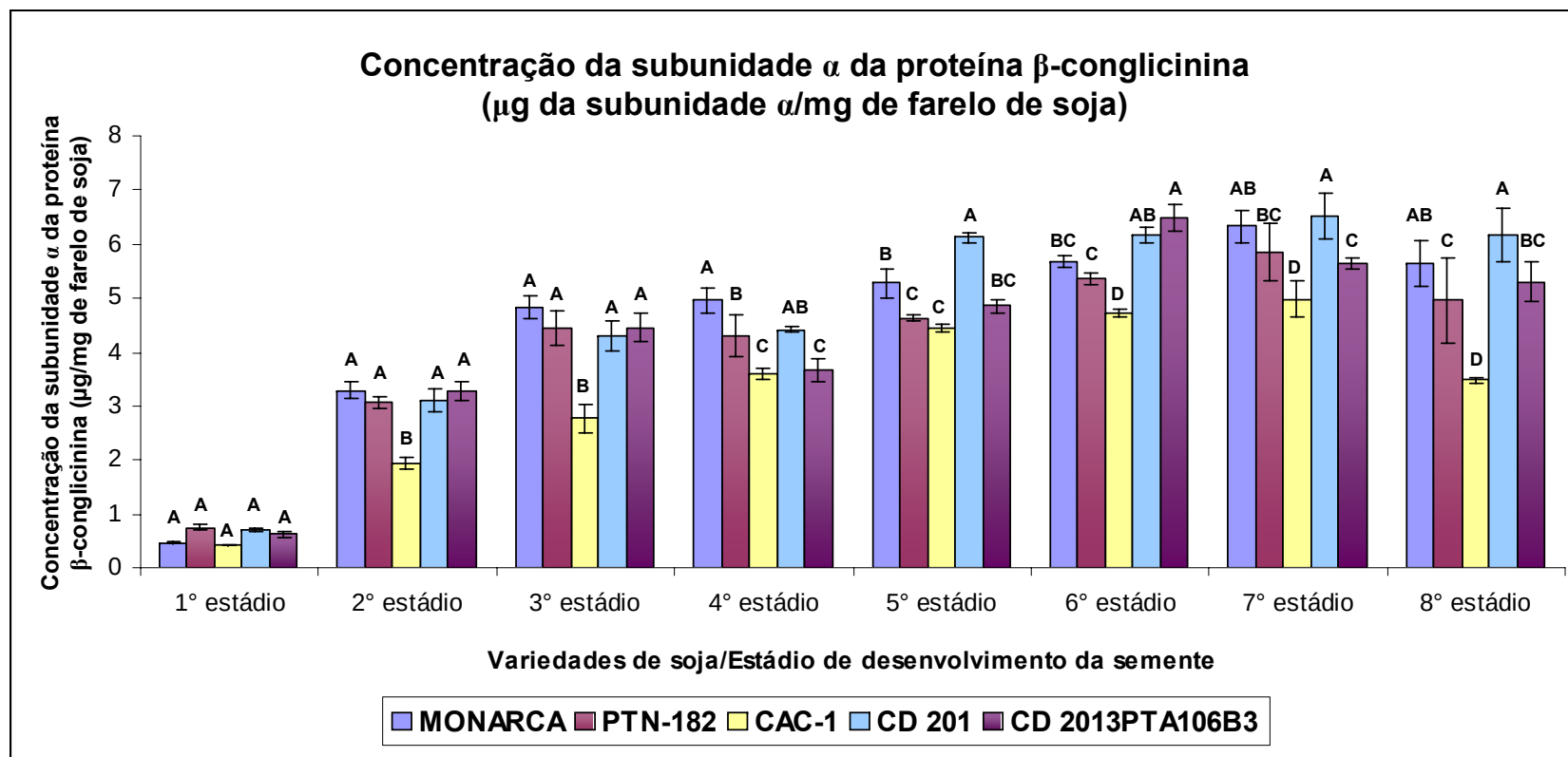


Figura A2: Concentração da subunidade α da β -conglícinina (μg da subunidade α/mg de farelo de soja) para o fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente”. A concentração do polipeptídeo em estudo foi determinada por SDS-PAGE/densitometria, em que cada amostra foi analisada em triplicata. As letras maiúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 5). As barras indicam o desvio-padrão.

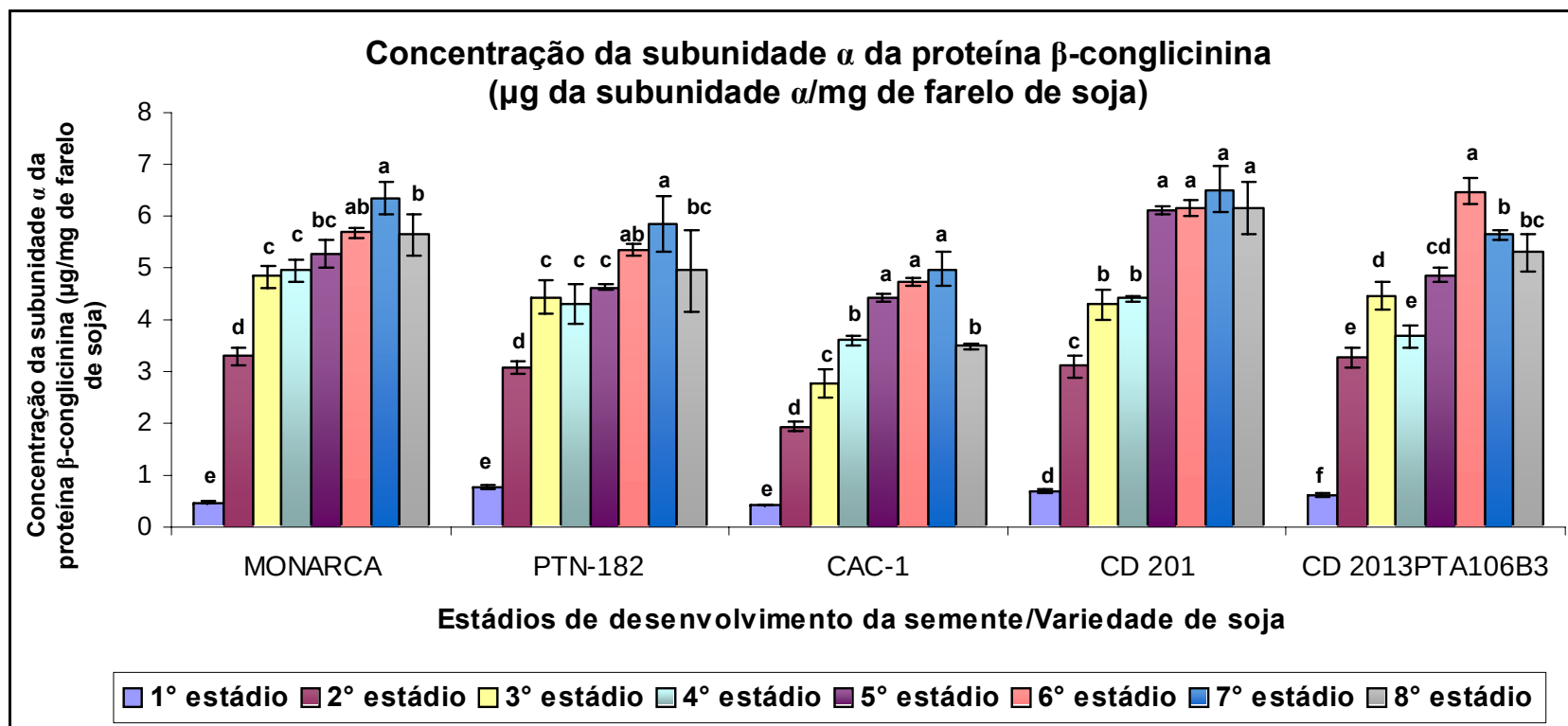


Figura A3: Concentração da subunidade α da β -conglícinina (μg da subunidade α /mg de farelo de soja) para o fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja”. A concentração do polipeptídeo em estudo foi determinada por SDS-PAGE/densitometria, em que cada amostra foi analisada em triplicata. As letras minúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 5). As barras indicam o desvio-padrão.

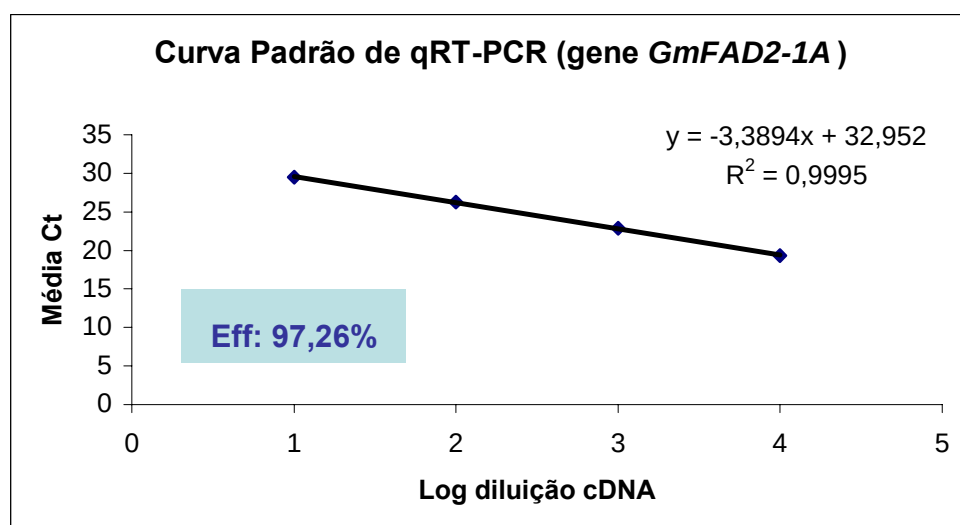
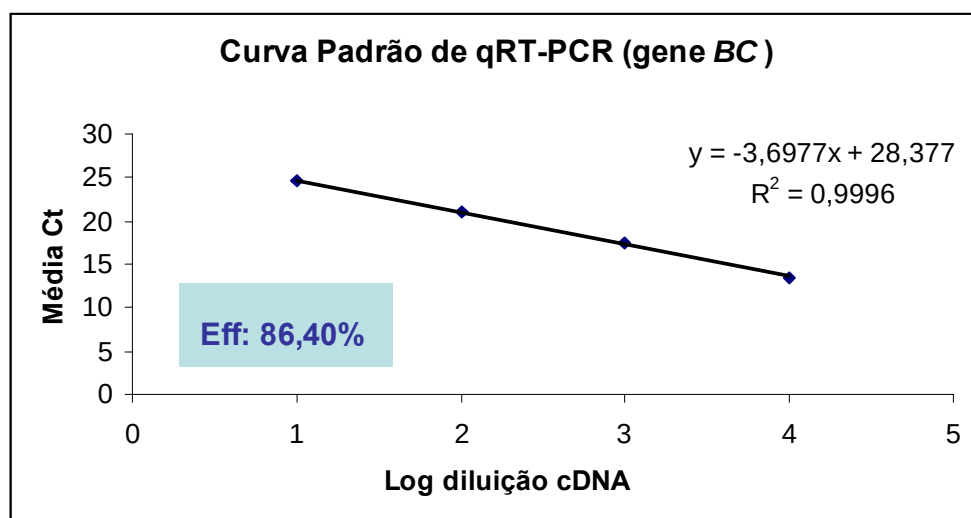


Figura A4: Eficiência (Eff) das reações de qRT-PCR para os pares de *primers* específicos dos genes alvos *BC* e *GmFAD2-1A*.

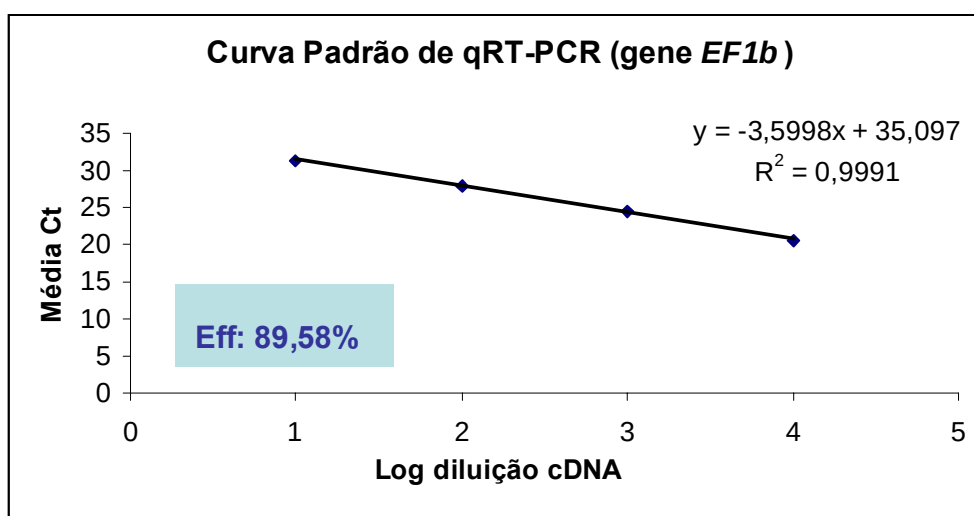
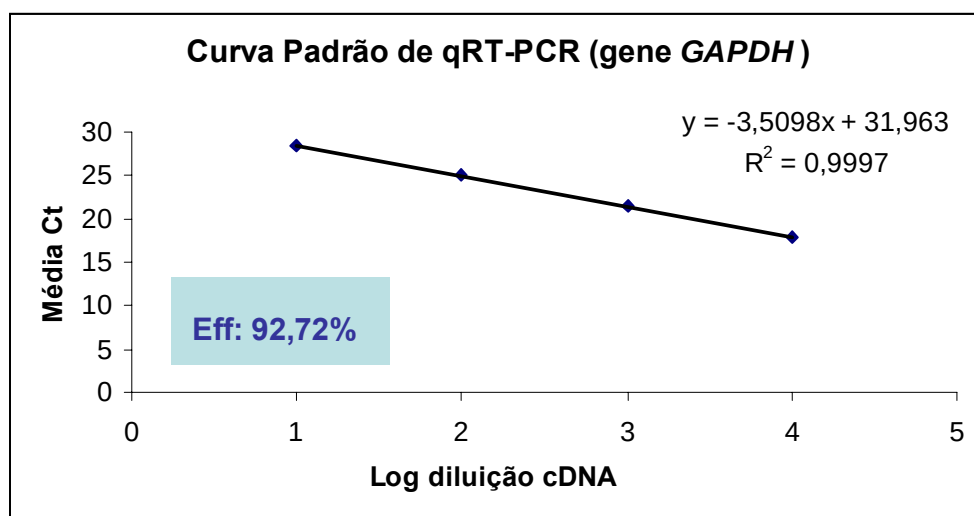


Figura A5: Eficiência (Eff) das reações de qRT-PCR para os pares de *primers* específicos dos genes endógenos *GAPDH* e *EF1b*.

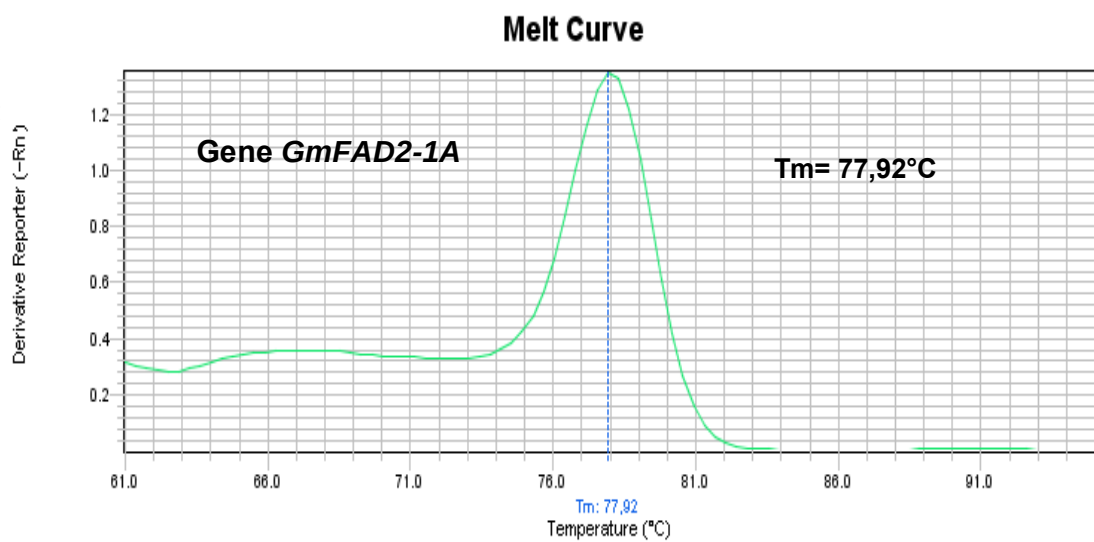
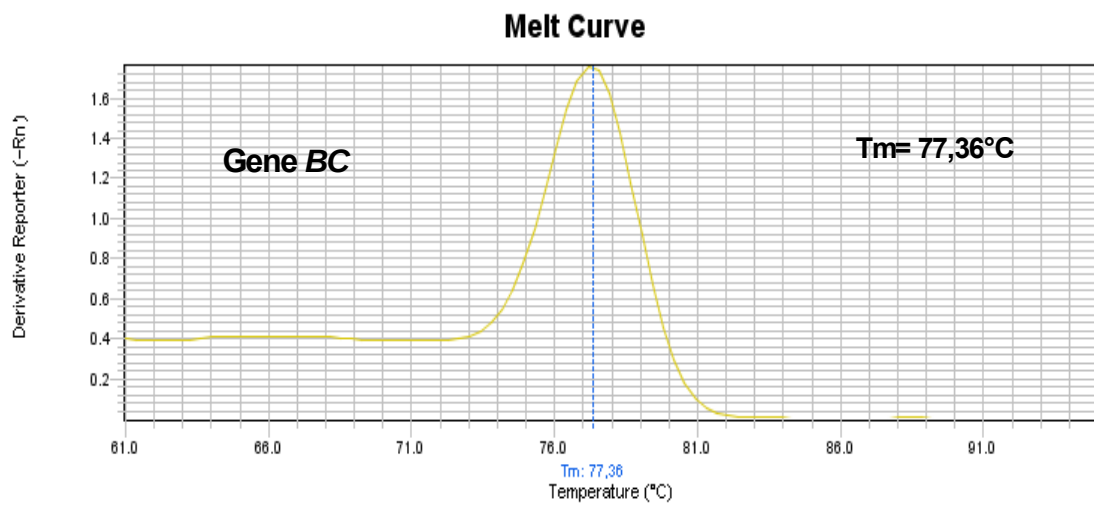


Figura A6: Curvas de dissociação (*Curva de Melt*) e Tm para os *amplicons* resultantes da amplificação dos genes alvos *BC* e *GmFAD2-1A* com os pares de *primers* específicos (MONARCA, 2º estágio).

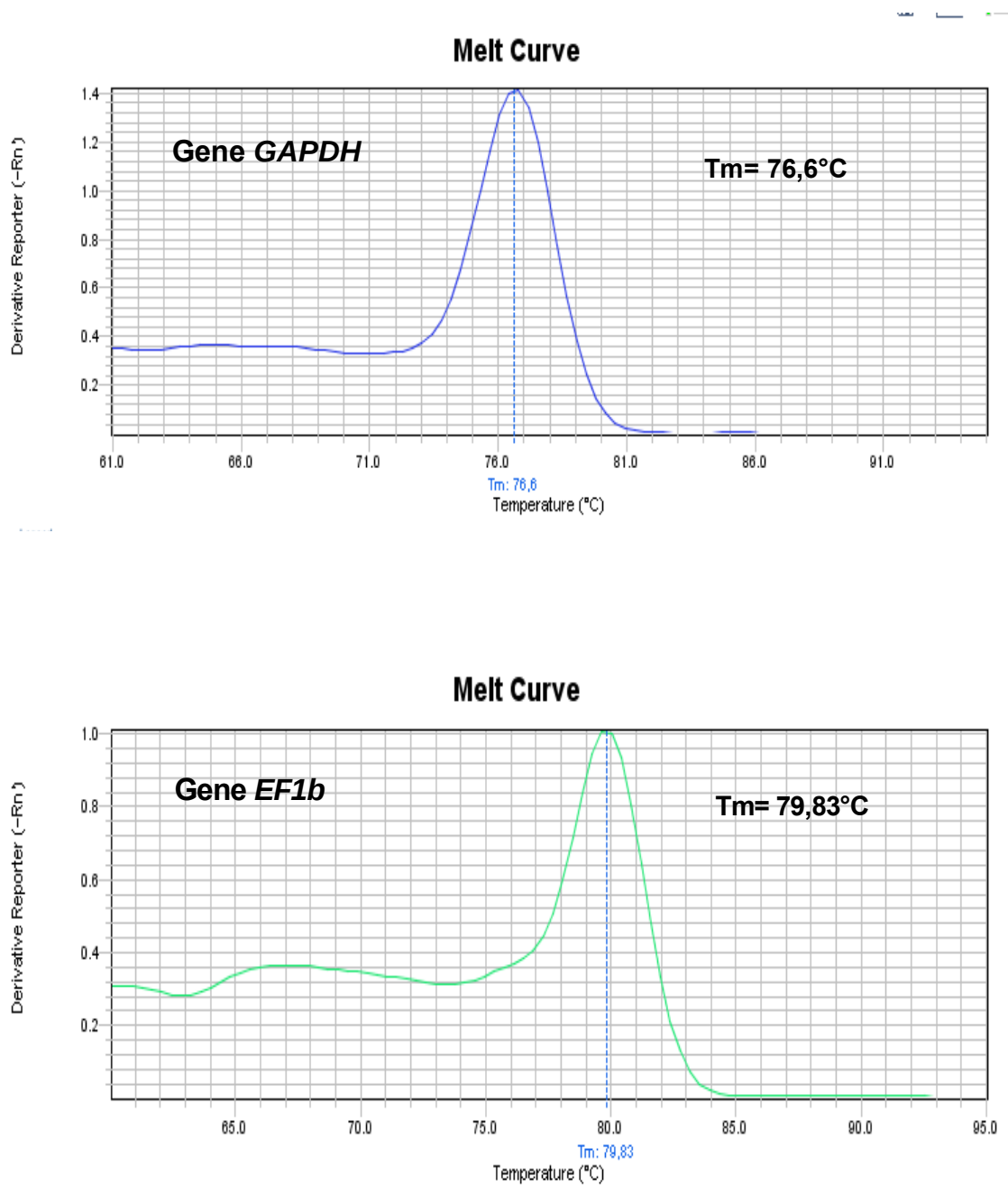


Figura A7: Curvas de dissociação (*Curva de Melt*) e T_m para os *amplicons* resultantes da amplificação dos genes endógenos *GAPDH* e *EF1b* com os pares de *primers* específicos (MONARCA, 2º estágio).

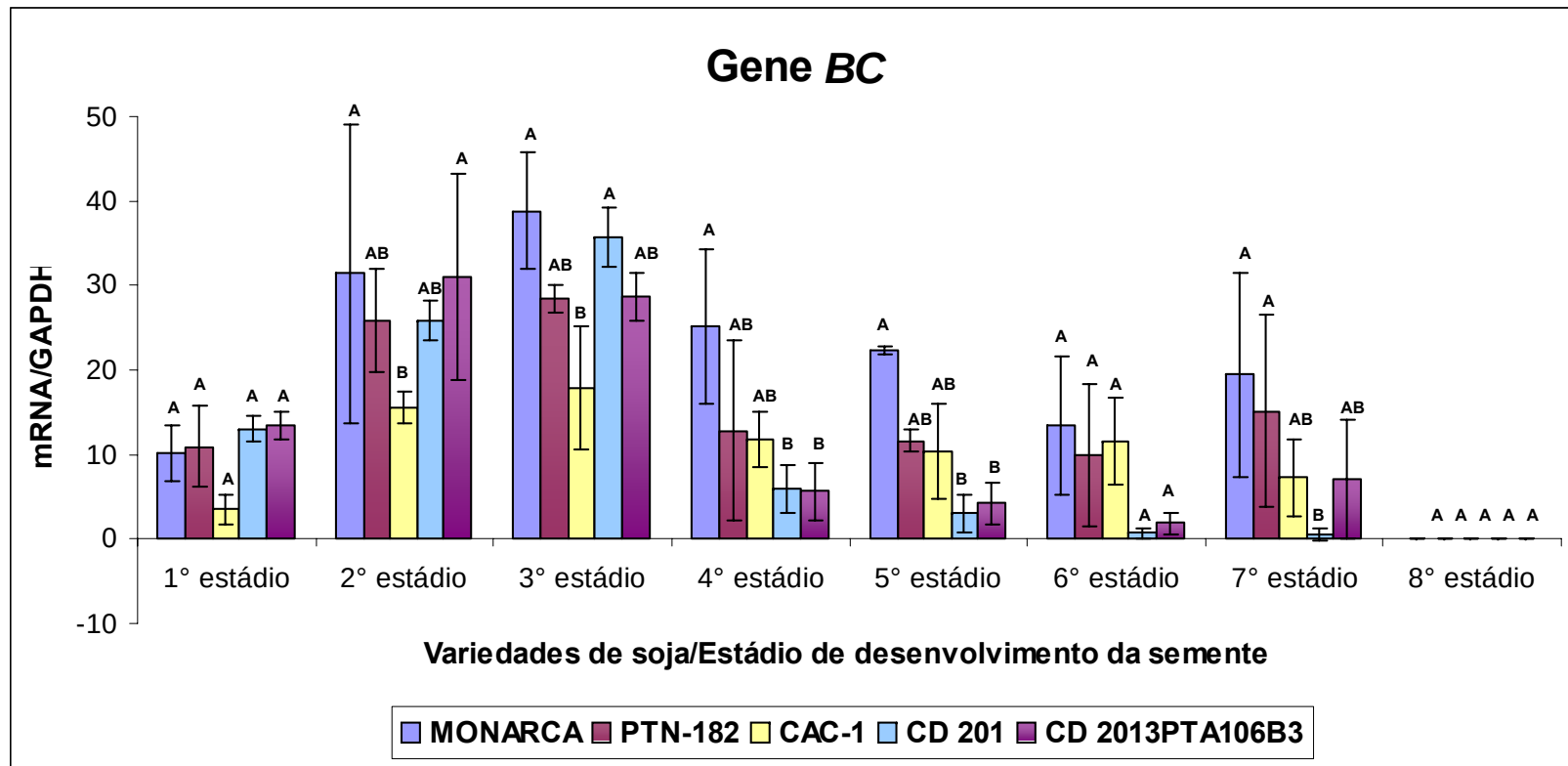


Figura A8: Padrão de expressão do gene BC para o fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente”. A expressão do gene BC em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras maiúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 7). As barras indicam o desvio-padrão.

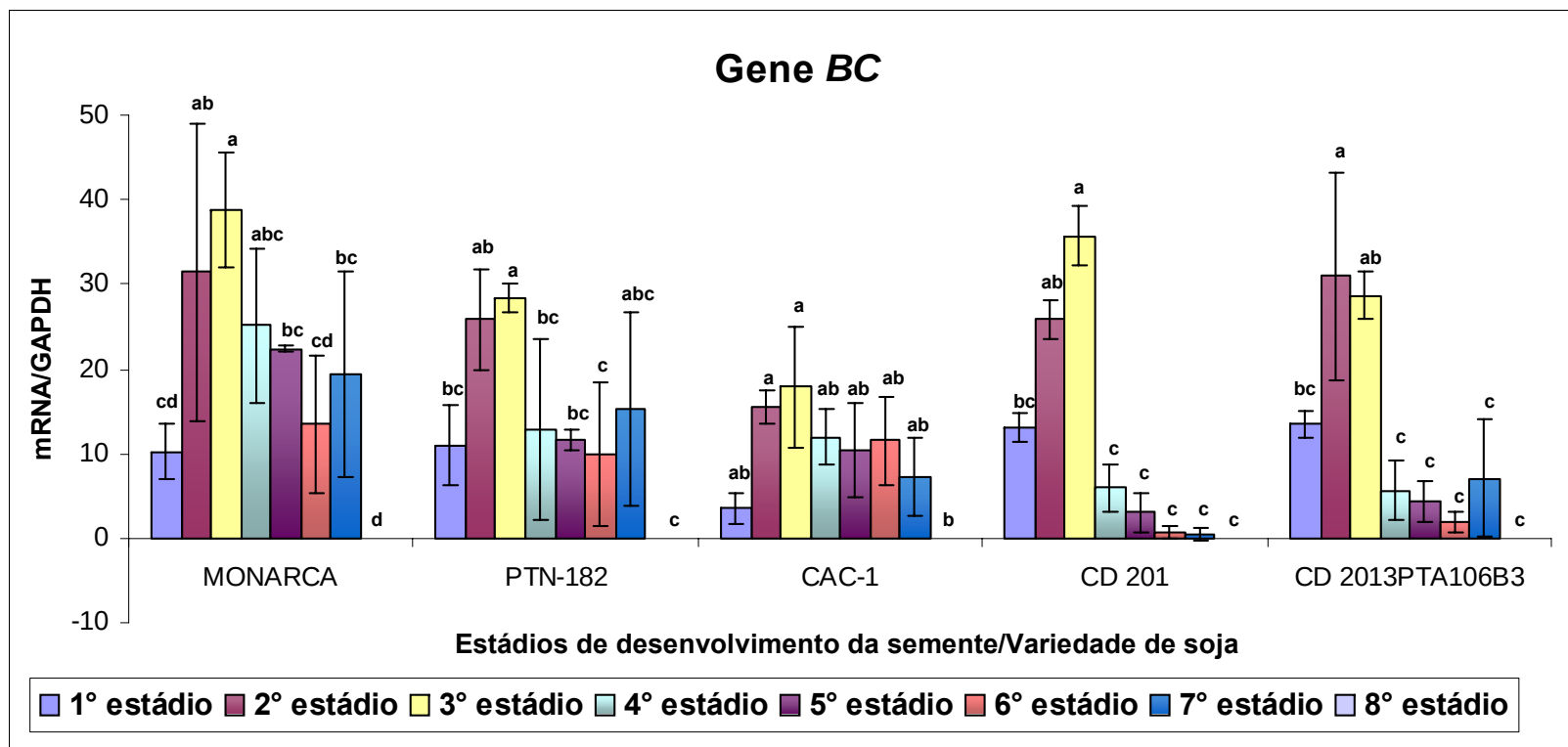


Figura A9: Padrão de expressão do gene BC para o fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja”. A expressão do gene BC em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras minúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 7). As barras indicam o desvio-padrão.

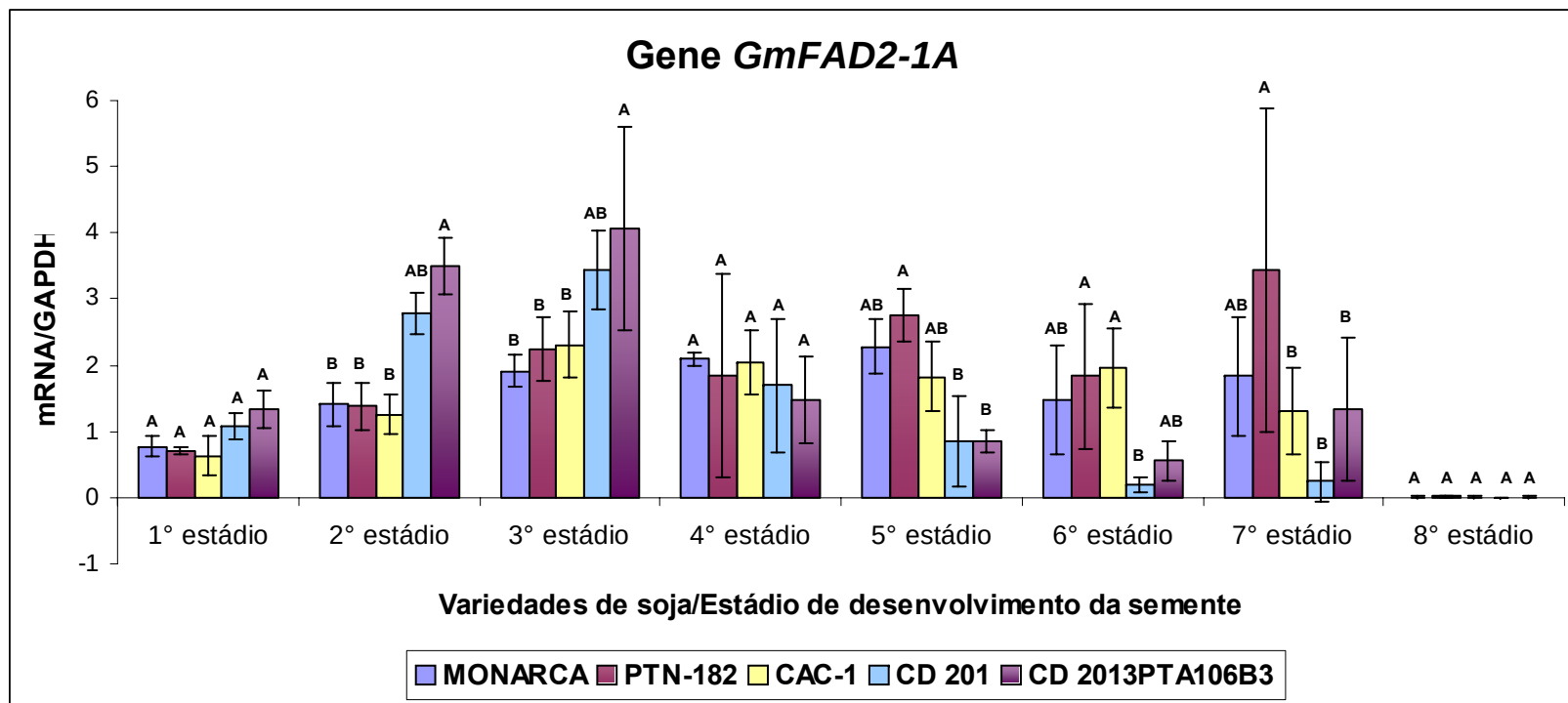


Figura A10: Padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* para o fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente”. A expressão do gene *GmFAD2-1A* em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras maiúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 9). As barras indicam o desvio-padrão.

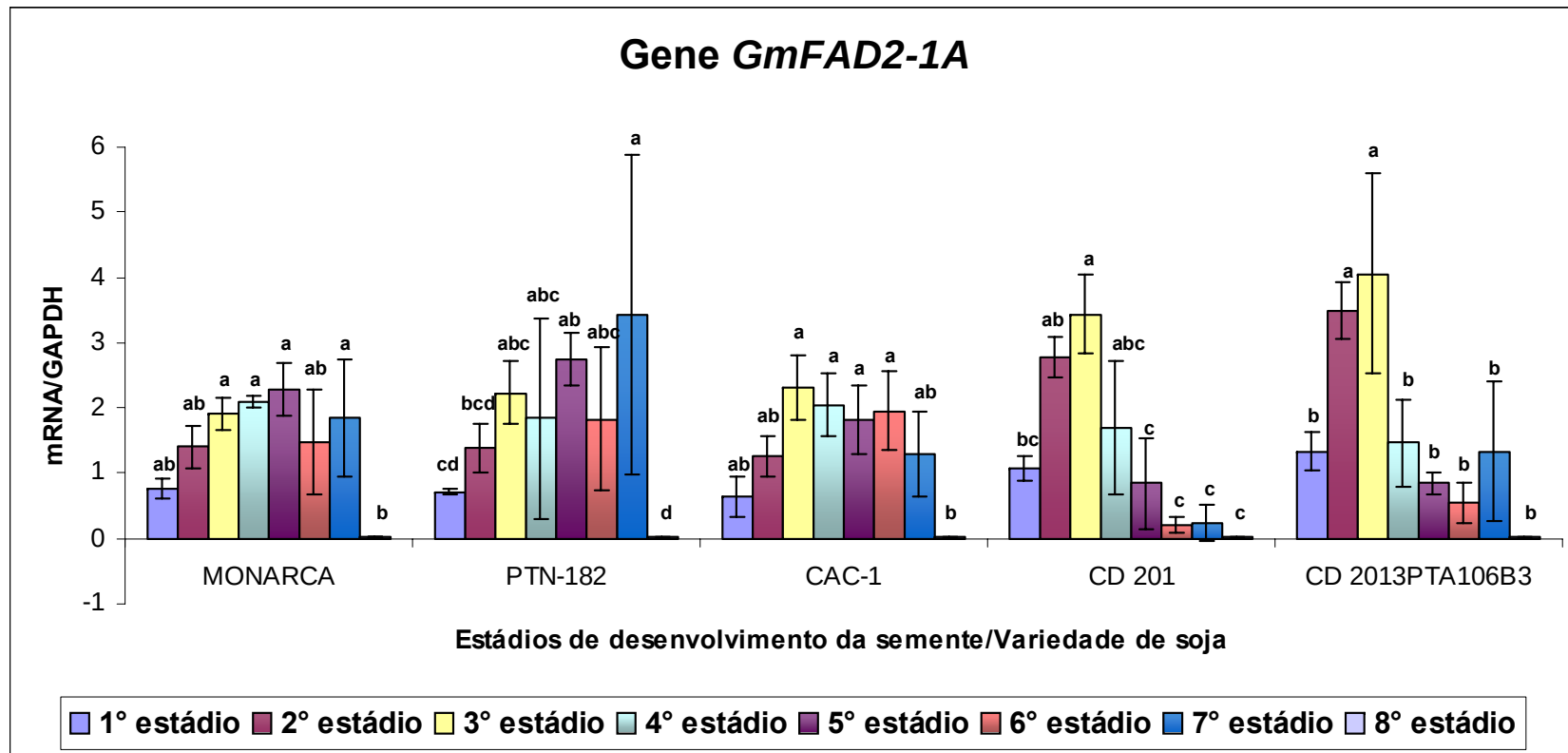


Figura A11: Padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* para o fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja”. A expressão do gene *GmFAD2-1A* em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno o gene *GAPDH*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras minúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 9). As barras indicam o desvio-padrão.

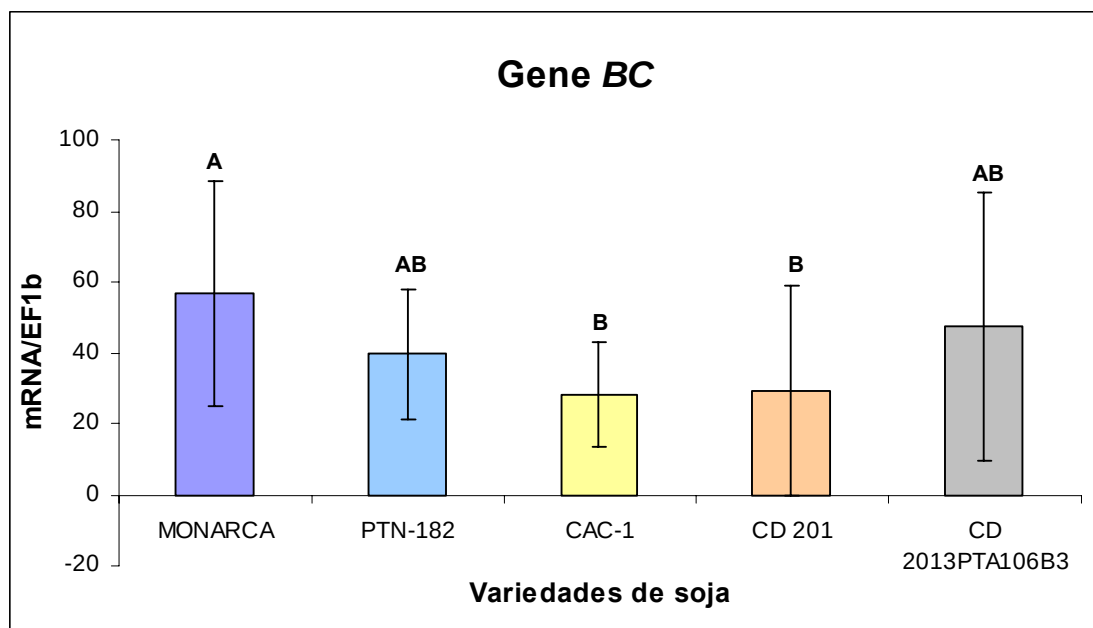


Figura A12: Padrão de expressão do gene *BC* para o fator “variedades de soja”. A expressão do gene *BC* em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras maiúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 11). As barras indicam o desvio-padrão.

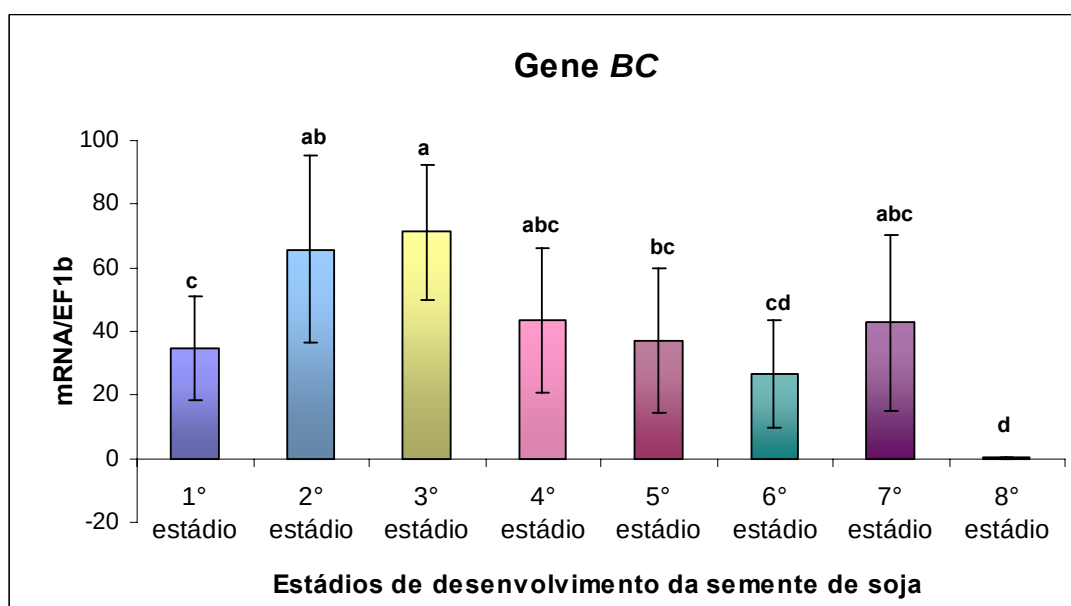


Figura A13: Padrão de expressão do gene *BC* para o fator “estádios de desenvolvimento da semente”. A expressão do gene *BC* em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras minúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 11). As barras indicam o desvio-padrão.

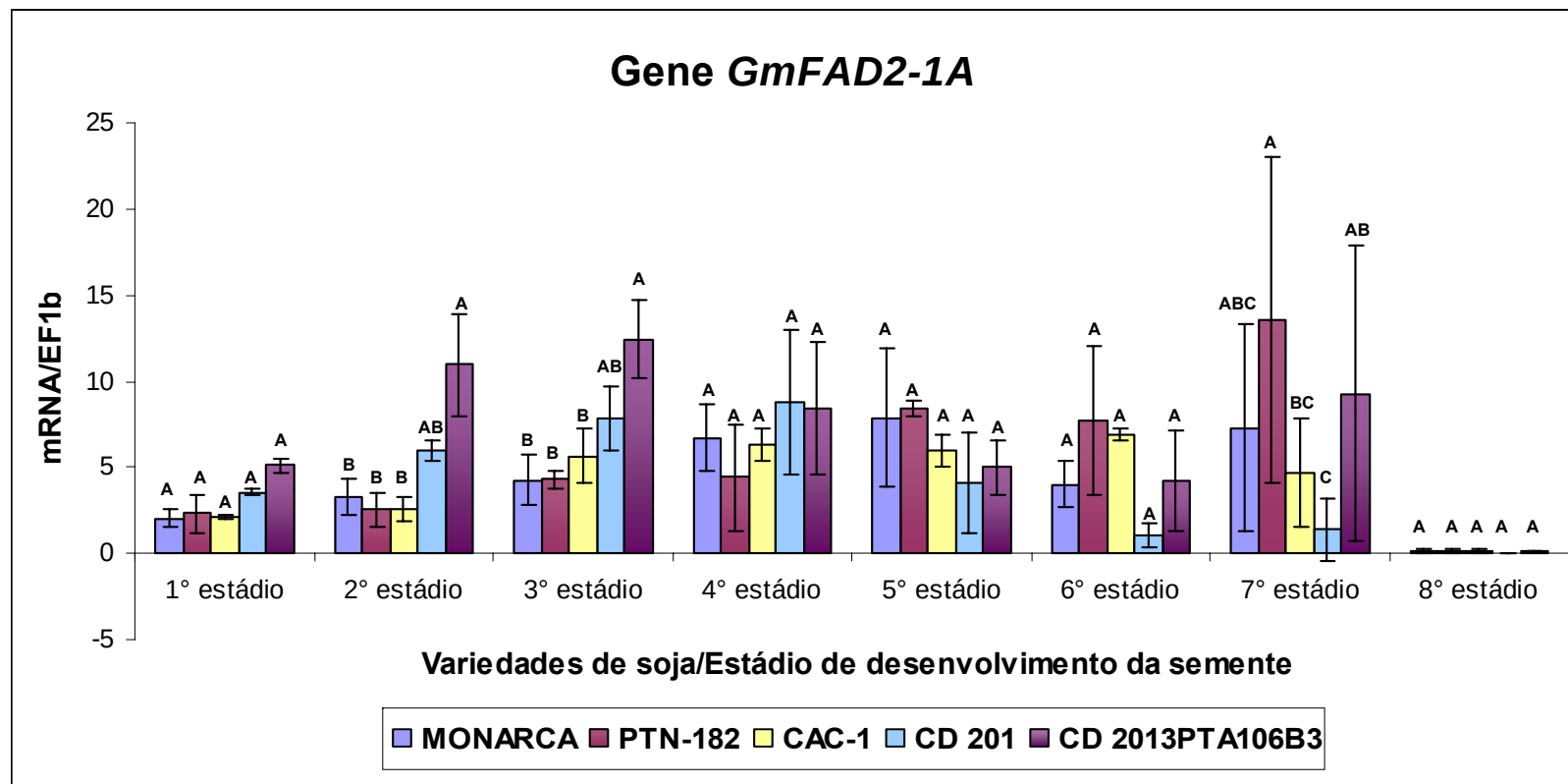


Figura A14: Padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* para o fator “variedades de soja” dentro de cada nível do fator “estádios de desenvolvimento da semente”. A expressão do gene *GmFAD2-1A* em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta Ct}$, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras maiúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 13). As barras indicam o desvio-padrão.

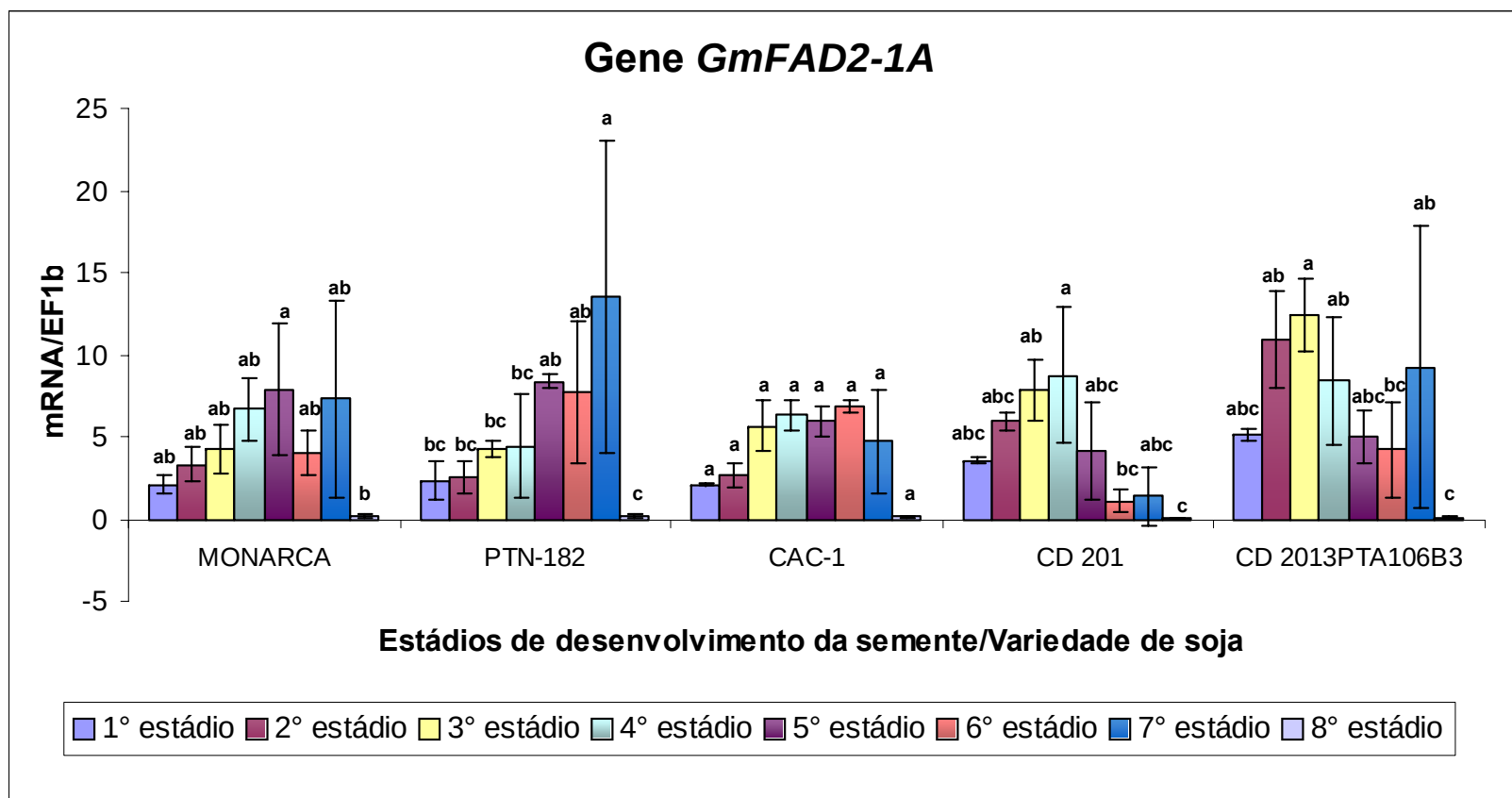


Figura A15: Padrão de expressão do gene *GmFAD2-1A* para o fator “estádios de desenvolvimento da semente” dentro de cada nível do fator “variedades de soja”. A expressão do gene *GmFAD2-1A* em 8 estádios de desenvolvimento da semente de 5 variedades de soja foi avaliada por PCR em tempo real (qRT-PCR). Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método $2^{-\Delta C_t}$, utilizando como controle endógeno o gene *EF1b*. Os cDNAs utilizados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas (n= 3 réplicas manuais). As letras minúsculas, acima de cada barra no gráfico, referem-se ao resultado do teste de Tukey, $p < 0,05$ (Tabela 13). As barras indicam o desvio-padrão.